

Aus der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Tierexperimentelle Untersuchung des Einflusses von  
N-Acetylcystein in Kombination mit Tirilazad Mesylat  
auf die mesenteriale Plasmaextravasation und  
Leukozytenadhärenz bei Endotoxinämie**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Julia Müller  
aus Darmstadt

**Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul**

Gutachter:       1. Prof. Dr. med. C. Spies  
                      2. Prof. Dr. med. M. Wendt  
                      3. Prof. Dr. med. Dr. Th. Hachenberg

Eingereicht:       29. August 2006

Datum der Promotion: 09. Januar 2007

## **Zusammenfassung**

Störungen im Bereich der Mikrozirkulation gelten als ursächlich für die Entstehung des Multiorganversagens bei Sepsis, wobei der Darm eine zentrale Rolle einnimmt. Aktivierte Leukozyten setzen u.a. Sauerstoffradikale frei, die entscheidend zur Zerstörung der endothelialen Integrität beitragen. Die Antagonisierung schädigender Mediatoren stellt ein Prinzip der adjunktiven Sepsis-Therapie dar, wobei die antioxidativ wirkenden Substanzen N-Acetylcystein (NAC) und Tirilazad Mesylat (TM) in mehreren Studien positive Effekte gezeigt haben.

In einer tierexperimentellen Untersuchung an Ratten wurde der Effekt der kombinierten Gabe von NAC und TM auf die mesenteriale Mikrozirkulation, auf die Freisetzung von TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, IL-10 und auf die Leukozytenzahl unter einer kontinuierlichen Lipopolysaccharidbelastung (LPS) von 10 mg/kg KG untersucht.

Die Beurteilung der mesenterialen Mikrozirkulation erfolgte mittels Intravitalmikroskopie. Hierbei wurde das Ausmaß der Leukozytenadhärenz am Endothel der mesenterialen Venolen als Maß für die Leukozytenaktivierung und die Plasmaextravasation als Parameter für die Endotheldysfunktion bestimmt. Dabei konnte während zwei Stunden Endotoxinämie die Zunahme der Plasmaextravasation an mesenterialen Venolen durch die kombinierte Gabe von NAC und TM nicht signifikant beeinflusst werden ( $p > 0,05$ ). Eine tendenziell erhöhte Plasmaextravasation unterstützt die Hypothese, dass leukozytenunabhängige Mechanismen für die Plasmaextravasation existieren. Während zwei Stunden Endotoxinämie kam es zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der fest adhärenen Leukozyten in der NAC/TM-Gruppe im Vergleich zur LPS-Gruppe ( $p = 0,001$ ). Durch die kombinierte Gabe von NAC und TM konnte die endotoxininduzierte Freisetzung von TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, IL-10 und die endotoxinbedingte Leukopenie nicht signifikant beeinflusst werden.

### **Schlüsselwörter:**

Sepsis, Intravitalmikroskopie, Plasmaextravasation, Leukozytenaktivierung, N-Acetylcystein, Tirilazad Mesylate, Interleukine

## **Abstract**

Disturbances of the microcirculation are causal for the pathophysiology of multiorgan failure related to sepsis in which the gut plays a central part. Activated leukocytes release i.e. oxygen radicals which decisively contribute to the destruction of the endothelial integration. To antagonize the damaging mediators is a principle of the adjunctive sepsis therapy in which the antioxidant agents N-acetylcysteine (NAC) and tirilazad mesylate (TM) showed positive effects in several studies.

The effect of the combined administering of NAC and TM under continuous lipopolysaccharide (LPS) exposure of 10 mg/kg BW on the mesenteric microcirculation, on the release of TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, IL-10 and on the number of leukocytes was examined in an animal study on rats. The appraisal of the microcirculation was done by intravital microscopy. The degree of leukocyte adherence on the endothelium of mesenteric venules was determined for the degree of leukocyte activation, and the plasma extravasation was the parameter for the endothelial dysfunction.

The increase of plasma extravasation on mesenteric venules during 2 hours of endotoxemia could not be affected significantly by the combined administering of NAC and TM. The tendency of increased plasma extravasation supports the hypothesis of the existence of a leukocyte independent mechanism of plasma extravasation. During 2 hours of endotoxemia the NAC/TM group showed a significant decrease in the number of firmly adherent leukocytes in comparison to the LPS group. There was no significant effect on the endotoxin induced release of TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, IL-10 and the endotoxin induced leukopenia by the combined administration of NAC and TM.

## **Keywords:**

sepsis, intravital microscopy, plasma extravasation, leukocyte activation, N-acetylcysteine, tirilazad mesylate, interleukins

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>3</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>4</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>7</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>11</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>12</b>
1.1 Sepsis.....	12
1.1.1 Geschichte.....	12
1.1.2 Definitionen.....	13
1.1.3 Inzidenz und Mortalität.....	16
1.1.4 Ätiologie und Pathogenese.....	17
1.1.4.1 Grundlegende Mechanismen.....	17
1.1.4.2 Endotoxin und Endotoxinrezeptoren.....	17
1.1.4.3 Mediatoren.....	20
1.1.4.4 Reaktive Sauerstoffspezies.....	23
1.1.4.5 Leukozyten und Leukozyten-Endothel-Interaktion.....	24
1.1.4.6 Endothelschädigung und Plasmaextravasation.....	29
1.1.5 Bedeutung des Intestinums für die Pathogenese der Sepsis.....	30
1.2 Therapiekonzepte bei Sepsis.....	33
1.3 N-Acetylcystein.....	36
1.3.1 Allgemeines.....	36
1.3.2 Pharmakokinetik.....	36
1.3.3 Pharmakodynamik.....	36
1.3.4 Klinische Anwendung/Effekte.....	37
1.4 Tirilazad Mesylat.....	37
1.4.1 Allgemeines.....	37
1.4.2 Pharmakokinetik.....	38
1.4.3 Pharmakodynamik.....	39
1.4.4 Klinische Anwendung / Effekte.....	39
1.5 Ergebnisse bisheriger Forschungen.....	40
1.5.1 N-Acetylcystein.....	40
1.5.1.1 Experimentelle Untersuchungen.....	40
1.5.1.2 Klinische Untersuchungen.....	40
1.5.2 Tirilazad Mesylat.....	41
1.5.2.1 Experimentelle Untersuchungen.....	41
1.5.2.2 Klinische Untersuchungen.....	42
<b>2 Herleitung der Aufgabenstellung.....</b>	<b>43</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>44</b>
3.1 Tiere und Tierhaltung.....	44
3.2 Gruppeneinteilungen.....	44
3.3 Versuchsablauf.....	44
3.4 Narkoseführung und Monitoring.....	45
3.5 Operative Techniken.....	46
3.6 Endotoxinmodell.....	47
3.7 Intravitalmikroskopie.....	48

3.7.1	Extravasation .....	50
3.7.2	Leukozyten-Endothel-Interaktion .....	50
3.8	Laborparameter .....	51
3.8.1	Leukozytenzahl .....	51
3.8.2	TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 .....	52
3.9	Statistische Methoden .....	52
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
4.1	Intravitalmikroskopie .....	53
4.1.1	Extravasation .....	53
4.1.2	Leukozytenadhärenz .....	54
4.1.2.1	Temporär adhärenente Leukozyten .....	54
4.1.2.2	Fest adhärenente Leukozyten .....	55
4.2	Laborparameter .....	56
4.2.1	Leukozytenzahl .....	56
4.2.2	TNF- $\alpha$ .....	57
4.2.3	Interleukin-1 $\beta$ .....	58
4.2.4	Interleukin-6 .....	59
4.2.5	Interleukin-10 .....	60
4.3	Hämodynamik .....	61
4.3.1	Mittlerer arterieller Blutdruck .....	61
4.3.2	Herzfrequenz .....	62
4.3.3	Atemfrequenz .....	63
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>64</b>
5.1	Diskussionsgrundlagen .....	64
5.2	Methodik .....	64
5.2.1	Sepsismodelle .....	64
5.3	Intravitalmikroskopie .....	68
5.3.1	Extravasation .....	68
5.3.2	Leukozytenadhärenz .....	70
5.3.2.1	Temporär adhärenente Leukozyten .....	70
5.3.2.2	Fest adhärenente Leukozyten .....	72
5.4	Laborparameter .....	74
5.4.1	Leukozytenzahl .....	74
5.4.2	TNF- $\alpha$ .....	75
5.4.3	Interleukin-1 $\beta$ .....	77
5.4.4	Interleukin-6 .....	78
5.4.5	Interleukin-10 .....	79
5.5	Hämodynamik .....	80
5.5.1	Mittlerer arterieller Blutdruck .....	80
5.5.2	Herzfrequenz .....	81
5.5.3	Atemfrequenz .....	82
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>83</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>99</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>100</b>
	<b>Erklärung an Eides Statt .....</b>	<b>101</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACCP	American College of Chest Physicians
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AF	Atemfrequenz
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BPI	Bactericidal Permeability-Increasing protein
CARS	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome
CD	Cluster of Differentiation
DIVI	Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensivmedizin und Notfallmedizin
CLP-Modell	Cecal Ligation and Puncture-Modell
CRP	C-reaktives Protein
CSF	Colony-Stimulating Factor
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DSG	Deutsche Sepsis-Gesellschaft
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays
ENP	Endotoxin-Neutralizing-Protein
ESICM	European Society for Intensive Care Medicine
FADD	Fas-Associated Death Domain protein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

GALT	Gut Associated Lymphatic Tissue
GPI	Glycophosphatidylinositol
h	Stunde
HCO <sub>3</sub>	Hydrogencarbonat
HDL	High Density Lipoprotein
HF	Herzfrequenz
HLA	Human Leukocyte Antigen
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
ICAM	Intercellular Adhasion Molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IVM	Intravitalmikroskopie
KG	Körpergewicht
LAF	Lymphocyte Activating Factor
LALF	Limulus Anti-LPS Factor
LDL	Low Density Lipoprotein
LEI	Leukozyten-Endothel-Interaktion
LFA	Lymphocyte Function Associated Antigen
LPB	Lipopolysaccharide Binding protein
LPS	Lipopolysaccharid
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub>
Mac-1 Antigen	Macrophagen-1 Antigen



MAdCAM	Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule
MAP	Mean arterial blood pressure
MARS	Mixed Antagonistic Response Syndrome
mCD	molecular Cluster of Differentiation
MHC-II	Major Histocompatibility Complex-II
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrom
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NASCIS	National Acute Spinal Cord Injury Study
NF- $\kappa$ b	Nukleärer Faktor- $\kappa$ b
paCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck
PAF	Platelet Activating Factor
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
pCO <sub>2</sub> -Gap	Kohlendioxidpartialdruck-Differenz
PDR <sub>ICG</sub>	Plasma-Disappearance-Rate von Monoethylglycinexylidid
PDR <sub>MEGX</sub>	Plasma-Disappearance-Rate von Monoethylglycinexylidid
PECAM	Platelet-Endothelial Cell Adhasion Molecule
pH <sub>i</sub> -Wert	intramuköser instestinaler ph-Wert
PMN	Polymorphonuclear Neutrophils
PROWESS	Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis

ROS	Reactive Oxygen Species
s	Sekunde
SCCM	Society of Critical Care Medicine
sCD	soluble Cluster of Differentiation
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOD	Superoxiddismutase
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SSC	Surviving Sepsis Campaign
TM	Tirilazad Mesylat
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRADD	TNF-R1-Associated Death Domain protein
VO <sub>2</sub>	systemischer Sauerstoffverbrauch
XDH	Xanthindehydrogenase
XO	Xanthinoxidase

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Glukokortikoid 6a-Methylprednisolon (links), 21-Aminosteroid U-74389G (rechts) .....	38
Abbildung 2: Versuchsablauf .....	45
Abbildung 3: Versuchsaufbau .....	49
Abbildung 4: Plasmaextravasation .....	53
Abbildung 5: Anzahl der temporär adhärenenten Leukozyten (Roller) .....	54
Abbildung 6: Anzahl der fest adhärenente Leukozyten (Sticker) (Sticker) a $p < 0,001$ Endotoxin vs. Kontrolle; b $p = 0,001$ Endotoxin vs. NAC/TM, c $p = 0,009$ Endotoxin vs. Endotoxin 0h, d $p = 0,028$ Kontrolle vs. Kontrolle 0h, e $p = 0,001$ Endotoxin vs. Kontrolle, f $p = 0,013$ Endotoxin vs. Endotoxin 0h .....	55
Abbildung 7: Leukozytenzahl a $p < 0,001$ Kontrolle vs. Endotoxin, b $p < 0,001$ Kontrolle vs. NAC/TM, c $p = 0,007$ Kontrolle vs. Kontrolle 0h, d $p < 0,001$ Kontrolle vs. Endotoxin, e $p = 0,001$ Kontrolle vs. NAC/TM, f $p = 0,005$ Endotoxin vs. Endotoxin 0h, g $p = 0,005$ NAC/TM vs. NAC/TM 0h .....	56
Abbildung 8: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen a $p < 0,001$ Kontrolle vs. Endotoxin, b $p < 0,001$ Kontrolle vs. NAC/TM, c $p = 0,005$ Kontrolle vs. Kontrolle 0h, d $p = 0,005$ Endotoxin vs. Endotoxin 0h, e $p = 0,005$ NAC/TM vs. NAC/TM 0h, f $p < 0,001$ Endotoxin vs. Kontrolle, g $p = 0,005$ Endotoxin vs. Endotoxin 0h, h $p < 0,001$ NAC/TM vs. Kontrolle, i $p = 0,005$ NAC/TM vs. NAC/TM 0h .....	57
Abbildung 9: Interleukin-1 $\beta$ -Konzentrationen a $p < 0,001$ Kontrolle vs. Endotoxin, b $p < 0,001$ Kontrolle vs. NAC/TM, c $p = 0,005$ Endotoxin vs. Endotoxin 0h, d $p = 0,005$ NAC/TM vs. NAC/TM 0h, e $p < 0,001$ Kontrolle vs. Endotoxin, f $p < 0,005$ Kontrolle vs. NAC/TM, g $p = 0,005$ Endotoxin vs. Endotoxin 0h, h $p = 0,005$ NAC/TM vs. NAC/TM 0h .....	58
Abbildung 10: Interleukin-6-Konzentrationen a $p < 0,001$ Kontrolle vs. Endotoxin, b $p < 0,001$ Kontrolle vs. NAC/TM, c $p = 0,005$ Kontrolle vs. Kontrolle 0h, d $p = 0,005$ Endotoxin vs. Endotoxin 0h, e $p = 0,005$ NAC/TM vs. NAC/TM 0h, f $p < 0,001$ Kontrolle vs. Endotoxin, g $p < 0,001$ Kontrolle vs. NAC/TM, h $p = 0,005$ Kontrolle vs. Kontrolle 0h, i $p = 0,001$ Endotoxin vs. NAC/TM .....	59
Abbildung 11: Interleukin-10-Konzentrationen a $p = 0,001$ Kontrolle vs. Endotoxin, b $p < 0,001$ Kontrolle vs. NAC/TM, c $p = 0,005$ Kontrolle vs. Kontrolle 0h, d $p = 0,005$ Endotoxin vs. Endotoxin 0h, e $p = 0,005$ NAC/TM vs. NAC/TM 0h, f $p < 0,001$ Kontrolle vs. Endotoxin, g $p < 0,005$ Kontrolle vs. NAC/TM, h $p = 0,005$ Kontrolle vs. Kontrolle 0h .....	60
Abbildung 12: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) .....	61
Abbildung 13: Herzfrequenz (HF) a $p = 0,003$ Kontrolle vs. Endotoxin, b $p = 0,004$ Kontrolle vs. NAC/TM, c $p = 0,005$ Endotoxin vs. Endotoxin 0h, d $p = 0,008$ NAC/TM vs. NAC/TM 0h .....	62
Abbildung 14: Atemfrequenz (AF) .....	63

# **1 Einleitung**

## **1.1 Sepsis**

### **1.1.1 Geschichte**

Der Begriff „Sepsis“ stammt aus dem Griechischen und bedeutet soviel wie „Gärung“ oder „Fäulnis“. Schon Hippokrates stellte ca. 400 vor Christus die Hypothese auf, „dass eine bestimmte Erkrankung, die 7-14 Tage nach einer Verwundung auftritt, mit Fieber beginnt und häufig mit dem Tod endet, durch eine Fäulnis der Gewebe und dadurch freigesetzte Gifte verursacht würde“. Bis zur Mitte des 19. Jahrhunderts blieb diese pathophysiologische Erklärung zunächst bestehen (112).

Die von Semmelweis 1847 eingeführten antiseptischen Praktiken, wie z.B. die Händedesinfektion mit Chlorkalk, durch die die Mortalität im Wochenbett von 13,6% auf 1,5% abnahm, geschah unter der Vorstellung, dass dadurch die Übertragung eines putriden Giftes verhindert werden könnte. Dies stellte eine der ersten klinischen Studien zu Infektionskrankheiten dar (112, 119).

Mit der Begründung der modernen Mikrobiologie durch Louis Pasteur und Robert Koch und mit dem Nachweis von Bakterien 1860 war die Basis für eine rationalere Erklärung der Sepsis gegeben (112). 1885 definierte Ziegler in seinem Lehrbuch der Pathologie die Sepsis als „eine Vergiftung des Organismus durch Toxine, Toxalbumie, Fermente und andere Produkte bakteritischer Zersetzung, also eine septische Intoxikation“. Hugo Schottmüller formulierte 1914 anlässlich der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin die erste Definition der Sepsis:

„Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem aus konstant, oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, derart, dass durch die Invasion subjektiv oder objektiv Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“ (178).

Das von Alexander Fleming 1928 entdeckte Penicillin verhalf zum ersten wesentlichen Fortschritt in der Behandlung von Infektionskrankheiten (156). Der verbreitete Einsatz der nachfolgenden Aminopenizilline und der Cephalosporine in den 60er Jahren führte jedoch bald, durch den Selektionsdruck dieser Antibiotika in Verbindung mit den noch nicht ausreichenden

Hygienemaßnahmen, zu einem konzentrierten Auftreten nosokomialer gram-negativer Sepsisfälle (112).

Das intensivmedizinische Monitoring verbesserte sich stetig und es wurden zunehmend adjuvante medikamentöse Behandlungen entwickelt. 1987 wurde in zwei Multicenter-Studien der Einsatz des Methylprednisolons in der adjuvanten Sepsistherapie geprüft (35, 36). Die Diskussion über diese Studien offenbarte, dass die Einschlusskriterien und die damit verbundene Mortalität der Studienkollektive die Ergebnisse beträchtlich beeinflussten (112). Die bisherige Sepsisdefinition reichte nicht aus, um vergleichbare Studien durchzuführen.

### **1.1.2 Definitionen**

1991 veröffentlichte Bone einen Vorschlag zur Definition der Sepsis und beschrieb dabei vier unterschiedliche Schweregrade dieses Krankheitsbildes:

1. Sepsis
2. Sepsis-Syndrom
3. Septischer Schock
4. Therapierefraktärer septischer Schock

Er erklärte die systemische Reaktion auf eine Infektion zur Basis des gesamten Syndroms (30). In dieser Definition blieb unberücksichtigt, dass auch nicht infektiös bedingte Erkrankungen wie Trauma oder Pankreatitis zu einem klinischen Bild führen können, das von dem des Sepsis-Syndroms nicht zu unterscheiden ist. Deshalb wurde 1991 im Rahmen einer Consensus Conference der amerikanischen „Society of Critical Care Medicine“ (SCCM) und des „American College of Chest Physicians“ (ACCP) eine einheitliche, verbindliche Krankheitsentität festgelegt:

„Da eine systemische inflammatorische Reaktion sowohl durch eine infektiöse, als auch durch eine nicht-infektiöse Ursache ausgelöst werden kann, wird der Begriff SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) eingeführt“ (34).

Das SIRS wird dabei gekennzeichnet durch das Vorliegen von mindestens 2 der folgenden Symptome:

- Körpertemperatur  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  oder  $\leq 36^{\circ}\text{C}$
- Erhöhte Herzfrequenz  $\geq 90/\text{min}$
- Tachypnoe (Atemfrequenz  $\geq 20/\text{min}$ ) oder Hyperventilation ( $\text{paCO}_2 \leq 32 \text{ mmHg}$ )
- Leukozytenzahl  $\geq 12000/\text{mm}^3$  oder  $\leq 4000/\text{mm}^3$  oder  $\geq 10\%$  Neutrophile

Ist das SIRS durch eine gesicherte infektiöse Ursache bedingt, bezeichnet man es als Sepsis (34). Da die Sepsis mit ihren Folgen ein Erkrankungsbild mit kontinuierlich ineinander übergehenden klinischen und pathophysiologischen Schweregraden ist, die wiederum die Prognose beeinflussen, unterscheidet man Sepsis, schwere Sepsis und den septischen Schock voneinander (34).

Die **schwere Sepsis** ist gekennzeichnet durch die oben aufgeführten Symptome plus Zeichen der Organdysfunktionen, Hypoperfusionszeichen oder septisch induzierter Hypotonie. Laktaterhöhung, Azidose, Oligurie oder eine akute Veränderung der Bewusstseinslage zählen zu den Hypoperfusionszeichen. Unter der septisch induzierten Hypotonie versteht man einen systolischen Blutdruck  $< 90 \text{ mmHg}$  oder einen Abfall von  $40 \text{ mmHg}$  vom Ausgangswert bei Ausschluss anderer Hypotonieursachen (34).

Den **septischen Schock** bezeichnet man als einen Krankheitszustand, der mit einer septischen Hypotension einhergeht, die trotz adäquater Volumensubstitution persistiert und mit Zeichen der Hypoperfusion oder Organdysfunktion vergesellschaftet ist. Patienten, die durch Behandlung mit inotropen oder vasokonstriktiven Substanzen nicht mehr hypotensiv sind, aber trotzdem Zeichen der Hypoperfusion oder Organdysfunktionen aufweisen, werden auch in das Syndrom des septischen Schockes eingeordnet (34).

Das Auftreten von Organdysfunktionen beim Akutkranken mit der Erfordernis einer (intensiv-) medizinischen Intervention zur Aufrechterhaltung der Homöostase wurde entsprechend der Richtlinien der ACCP/SCCM als MODS (Multiple Organ Dysfunction Syndrom) definiert (34).

Ein direkt im Rahmen eines Traumas infolge von Operationen mit ausgedehnter Gewebeerstörung oder nach ausgeprägten Schockzuständen entstehendes Multiorganversagen nennt man primäres Multiorganversagen (34). Das sekundäre Multiorganversagen entwickelt sich nach einer stabilen Phase durch einen zweiten Insult, wie z.B. einer bakteriellen Infektion -“two-hit“-Modell (55).

Aufgrund zunehmend verfeinerter diagnostischer Methoden können heute verschiedene Aktivierungszustände des Immunsystems während der Sepsis charakterisiert werden. Die systemische inflammatorische Antwort auf eine Infektion ist die Folge einer unphysiologischen Aktivität inflammatorischer und antiinflammatorischer Mediatoren. Die Verschiebung des Gleichgewichtes zur inflammatorischen Seite mit vermehrter Aktivität proinflammatorischer Zytokine wird als SIRS charakterisiert, ein Übergewicht der antiinflammatorischen Mediatoren als „Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome“- CARS (32). Nach Bone et al. wird unter CARS im engeren Sinne ein HLA-Nachweis von <30% auf Monozyten mit einer verminderten Fähigkeit zur Produktion von Entzündungs-Zytokinen, wie z.B. Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-6 (IL-6) definiert (37).

Oft treten pro- und antiinflammatorische Reaktionen im Krankheitsverlauf simultan auf, was als ein gemischt antagonistisches Reaktionssyndrom - „Mixed Antagonistic Response Syndrome“ (MARS) bezeichnet wird (32).

Die Definitionen der ACCP/SCCM-Consensus-Conference sind in der internationalen medizinischen Versorgung vor allem wegen ihrer eingeschränkten Spezifität wenig verbreitet. Zu dem ist in der gegenwärtigen „International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems“ -ICD-10 der Begriff der „Sepsis“ durch Anlehnung an eine rein mikrobiologisch orientierte Definition sehr weit und unscharf gefasst. Daher bemühen sich die ACCP und SCCM sowie andere internationale Fachgesellschaften, die Konsensuskriterien weiterzuentwickeln. Es wurde in Analogie zu der TNM-Klassifikation maligner Tumore ein Klassifikationssystem vorgeschlagen, das die Patienten auf der Grundlage von Prädisposition („P“), Infektion („I“), inflammatorischer Reaktion („R“) und Organdysfunktion („O“) nach ihrem Risiko stratifiziert.

Das sogenannte „PIRO“-Konzept bewertet dabei die Prädisposition im Sinne der Vorerkrankungen, die Infektion durch positiven Nachweis in Kulturen, die inflammatorische

Reaktion nach den SIRS Kriterien und der Konzentration des C-reaktiven Proteins (CRP), sowie die Organdysfunktion nach Scores wie z.B. dem „Sequential Organ Failure Assessment“-SOFA und dem MODS. Die Integration weiterer inflammatorischer Marker wie Procalcitonin und Interleukin-6 in die Risikobewertung der inflammatorischen Reaktion wird durch diverse Studien noch geprüft (44).

### **1.1.3 Inzidenz und Mortalität**

Die langjährige Entwicklung des Sepsisbegriffes und die nach wie vor weltweit von Klinikern, Epidemiologen und Mikrobiologen unterschiedlich benutzten Definitionen der „Sepsis“ machen deutlich, wie schwer es ist, international valide epidemiologische Daten zu erheben (159). Die weitverbreitetsten Daten stammen aus Statistiken des Center for Disease Control (CDC) in Atlanta. Darin wurde im Jahre 2000 eine weltweit jährliche Inzidenz der schweren Sepsis von ca. 3/1000 Einwohner und somit über 18 Millionen/Jahr angegeben. Darüber hinaus wird geschätzt, dass die Zahl der Sepsispatienten um 1,5% pro Jahr zunimmt (6, 97). Seit 1979 hat sich die Zahl der Menschen, die eine Sepsis erleiden, verdreifacht (130). Die Letalität dieser Erkrankung liegt in den letzten Jahren nahezu unverändert hoch bei 30-40% und steigt im septischen Schock bis auf über 70% an (6, 7). Die Anzahl der Todesfälle nahm in den letzten 2 Jahrzehnten um 83% zu. Somit rangierte die Diagnose „Sepsis“ in der Todesursachenstatistik der USA von 2000 auf Platz 10 (5). Auf interdisziplinären Intensivstationen stellt die Sepsis mit einer Inzidenz von 10-14% sogar die häufigste Todesursache dar (124, 184). Für Deutschland gibt es noch wenig valide Daten. Schätzungen gehen von 125000 bis 300000 Fällen pro Jahr aus (165). Nach einer Studie des Kompetenznetzes Sepsis (Sepnet) sterben in Deutschland jeden Tag durchschnittlich 162 Menschen an Sepsis. Die offizielle Todesursachen-Statistik des Statistischen Bundesamtes ging 2002 allerdings nur von 16,7 Sepsis-Toten pro Tag aus (45).

Als Ursache dieser Entwicklung kommen mehrere Faktoren in Frage. Zum einen erhöht sich in den meisten westlichen Staaten die durchschnittliche Lebenserwartung. Somit vergrößert sich die Zahl multimorbider älterer Patienten, die am stärksten gefährdet sind, an einer Sepsis zu erkranken. Für den Anstieg der Sepsis-Inzidenz trug zum anderen der medizinische Fortschritt bei, wie z.B. der zunehmende Invasivitätsgrad diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen, aggressivere Krebstherapien oder Immunsuppression bei Transplantationspatienten.



Hinzukommen verbesserte Überlebensraten bei Patientengruppen mit Sepsis-Prädisposition, worunter Frühgeborene und Patienten mit Begleiterkrankungen gezählt werden (15, 31). Nicht zuletzt hat der verbreitete Gebrauch von Breitbandantibiotika die Rate der Antibiotikaresistenzen und der nosokomialen Infektionen erhöht (150).

Der hohe personelle und materielle Aufwand, verbunden mit enormen Behandlungskosten bei der Intensivpflege septischer Patienten, verleiht der Therapie der Sepsis eine große sozioökonomische Relevanz (105). Ökonomische Analysen ergeben, dass 21-46% der Gesamtkosten für Intensivtherapie in Deutschland für die Sepsistherapie investiert werden (138).

### **1.1.4 Ätiologie und Pathogenese**

#### **1.1.4.1 Grundlegende Mechanismen**

Als Ursachen für die Sepsis oder das SIRS kommen neben Infektionen durch Bakterien, Viren und Pilze auch Insulte wie Trauma, Reperfusion, hypovolämischer/hämorrhagischer Schock, Pankreatitis oder auch extrakorporale Zirkulation in Betracht (34). Da die Sepsis und das SIRS pathogenetisch in vielen Abläufen vergleichbar sind, werden diese pathophysiologischen Ereignisse exemplarisch an Hand einer Sepsis durch gramnegative Erreger erläutert. Ein Toxin gramnegativer Erreger in Form von Lipopolysaccharid (LPS) von *Escherichia coli* (E.coli) wurde auch in unserem tierexperimentellen Modell eingesetzt.

Gramnegative Infektionen (v.a. *E.coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp.) waren in den 60er bis frühen 70er Jahren die dominierende Ursache für die schwere Sepsis. In den letzten beiden Dekaden nahmen grampositive Infektionen (v.a. Staphylokokken, Streptokokken) zu, so dass heute von einem Verhältnis von 50:50 ausgegangen wird (26).

#### **1.1.4.2 Endotoxin und Endotoxinrezeptoren**

Endotoxine sind Lipopolysaccharide in der äußeren Lamellenhälfte der Zellmembran gram-negativer Bakterien. Dieses LPS kann durch Phenol-, Trichloroacetat- oder Chloroform-Phenol-Petroleum-Etherextraktion als Reinsubstanz gewonnen werden. Von außen nach innen baut es sich aus einem Polysaccharidanteil (O-Antigen), einem Kernoligosaccharid und einem für alle gramnegativen Bakterien typischen Lipidkomplex (A-Antigen) auf.

Das A-Antigen ist fest in der äußeren Schicht der Bakterienmembran verankert und kovalent mit dem O-Antigen verbunden, welches auf der Membranoberfläche des gramnegativen Bakteriums präsentiert wird. Da die molekulare Struktur des O-Antigens innerhalb der Bakterienspezies stark variiert, kann anhand dieses Antigenes eine Klassifizierung unterschiedlicher Stämme vorgenommen werden („fingerprint“). Gegen diesen Bestandteil des LPS werden bei Infektion des menschlichen Organismus Serotyp-spezifische Antikörper produziert, die zu einer Opsonierung und Phagozytose des Bakteriums führen. Das isoliert applizierte O-Antigen ist wenig toxisch (106).

Der größte Virulenzfaktor ist dem Lipid A zuzuordnen. Neben der pathophysiologischen Wirkung ist diese hochkonservierte Struktur unabdingbar für die LPS-Bindung an immunkompetente Zellen. Selbst wenn es ohne die anderen Komponenten (O-Antigen und Kernpolysaccharid) des LPS appliziert wird, induziert es ein breites Spektrum von septiformen Reaktionen, die mit dem klinischen Bild bei septischen Patienten vergleichbar sind (43, 155).

LPS wird von Bakterien entweder während ihres schnellen Wachstums oder ihrer Zerstörung freigesetzt. Im Intravasalraum bindet es sich an verschiedene Serumproteine und Rezeptoren. Es existieren Serumproteine, die durch Bindung des Endotoxins dessen Toxizität herabsetzen und somit zu einer Art Neutralisation beitragen können. Dabei handelt es sich z.B. um das „High Density Lipoprotein“-HDL, das „Low Density Lipoprotein“-LDL, oder das „Bactericidal Permeability-Increasing protein“-BPI (180).

Das BPI befindet sich physiologischerweise auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten, in ihren Granula und in geringer Konzentration im Serum. Bei einer gramnegativen Infektion, bei der große LPS-Mengen freigesetzt werden, wird BPI vermehrt aus den azurophilen Granula LPS-aktivierter neutrophiler Granulozyten freigesetzt und bindet hochaffin das Lipid A des LPS. Da diese Bindung von BPI nicht serotypspezifisch eingegangen wird, kann es verschiedene LPS-Formen neutralisieren. Dadurch besitzt es einen bedeutenden regulatorischen Einfluss bei der Beschränkung der durch LPS ausgelösten Inflammationsreaktion. In einer experimentellen Studie an Mäusen, Ratten und Kaninchen konnte bei zeitgleicher BPI-Applikation sowie BPI-Applikation 30 Minuten vor (pre-treatment) bis 60 Minuten nach Endotoxingabe (posttreatment) eine protektive Wirkung verzeichnet werden (180).

Neben den Serumproteinen, die durch Bindung von Endotoxin dessen Toxizität herabsetzen, sind die anderen Endotoxin-Rezeptoren aufzuführen, die zur Vermittlung und Verstärkung der Endotoxinwirkung im Sinne einer Opsonierung dienen. Dies ist vor allem das „Lipopolysaccharide Binding protein“ (LPB), welches in der Leber synthetisiert wird. Der LPB/LPS-Komplex induziert in Alveolarmakrophagen von Kaninchen eine 1000fach höhere und in menschlichen Alveolarmakrophagen eine 100fach höhere TNF- $\alpha$  Produktion als LPS alleine. Da das LPB sowohl am Transport von LPS zum endotoxinneutralisierenden HDL, als auch am Transport zum zellulären LPS-Rezeptor beteiligt ist, schreibt man ihm eine duale Rolle in der Interaktion mit Endotoxin zu (131, 180).

BPI und LBP werden durch ein Gen auf dem Chromosom 20 kodiert. Während der Sepsis sind beide Proteine in erhöhter Konzentration im Serum nachweisbar (80, 179). Dennoch können die gesamten physiologisch vorkommenden LPS-abschwächenden Proteine oft eine systemische Inflamationsreaktion nicht abwenden, da eine unzureichende Regulation proinflammatorischer Mediatoren dem im Wege steht (180).

Der zellständige Rezeptor für den LBP/LPS-Komplex ist das membranassoziierte Glykoprotein mCD14, das auf der Oberfläche von Monozytenvorläuferzellen und auf allen reifen myeloischen Zellen (aktivierte Monozyten, Makrophagen, Granulozyten) exprimiert wird (90, 206). Über einen Glycophosphatidylinositol (GPI)-Anker ist mCD14 an der Zellmembran fixiert und besitzt keine transmembrane Domäne. Dadurch ist mCD14 nicht zu einer intrazellulären Signaltransduktion befähigt (91, 92). Für die Signaltransduktion existiert neben mCD14 ein zusätzlicher Co-Rezeptor, der sogenannte Toll-like Rezeptor (108). Toll-like Rezeptoren vermitteln eine angeborene oder in der frühen Entwicklung erworbene Immunität („innate immunity“) und richten sich gegen Oberflächenstrukturen von pathogenen Keimen (Pathogen Associated Molecular Pattern -PAMP). Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zum einen zu einer Bildung von Substanzen mit unmittelbarer antimikrobieller Wirkung und zum anderen über eine Signaltransduktionskaskade zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. nukleärem Faktor- $\kappa$ B -NF- $\kappa$ B (23, 144). Daraus resultiert die überwiegende Bildung von proinflammatorischen Mediatoren (z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) neben anderen Mediatoren, die nicht unmittelbar proinflammatorisch agieren, jedoch z.B. Fieber auslösen können (53).

Auch Zellen, die den CD14-Rezeptor auf ihrer Oberfläche nicht exprimieren, wie z.B. Endothelzellen, können durch Bindung des LPS/LPB-Komplexes an lösliche CD14-Rezeptoren stimuliert werden (71). GPI-spezifische Phospholipasen C und D spalten den Rezeptor aus ihrer Verankerung, genannt „shedding“, und führen zur löslichen Form des LPS-Rezeptors (soluble CD14 -sCD14).

Diese enzymatische Abspaltung entsteht sowohl spontan als auch verstärkt durch LPS und TNF- $\alpha$ . Möglicherweise besitzt sCD14 dadurch eine immunmodulierende Wirkung (18). Da sCD14 einerseits die zelluläre Aktivierung mCD14-negativer Zellen durch geringe Mengen LPS vermittelt, andererseits bei großen Mengen eine neutralisierende Fähigkeit ausbildet, wird ihm ebenfalls, wie dem LPB, eine duale Rolle zugeschrieben. Durch die Bindung von LPS an erhöhten Mengen sCD14 wird eine überschießende Aktivierung mCD14-positiver Zellen verhindert (180).

Da ein CD14-Verlust nicht zu einem totalen Reaktionsverlust gegenüber LPS führt, werden zusätzliche CD14-unabhängige Endotoxin-Signal-Übermittlungswege postuliert, wie z.B. leukozytäre LPS-Rezeptoren der Familie der CD11b/CD18-Glykoproteine, auch genannt  $\beta$ 2-Integrin oder Mac-1 Antigen (43, 53, 104). So genannte „Scavenger-Rezeptoren“ auf Makrophagen, die LPS binden, spielen ebenfalls eine Rolle bei der Erkennung und Entgiftung von LPS. Jedoch führt die Bindung an diese Rezeptoren zu keiner Aktivierung der Makrophagen und Monozyten (60, 64, 87).

#### **1.1.4.3 Mediatoren**

Eine Vielzahl von Reaktionen folgt der LPS-Aktivierung sensibler Zellen. Beispiele sind Zytokinfreisetzung, Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, Elastasefreisetzung, Sekretion von Lipidmediatoren (Eicosanoide, „Platelet Activating Factor“ -PAF), Aktivierung der Gerinnungskaskade, Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Granulozyten, sowie die Freisetzung vasoaktiver Mediatoren (180). Normalerweise findet eine adäquate Abwehrreaktion des Immunsystems statt und die Infektion wird beseitigt. Eine überschießende Immunreaktion führt zur Schädigung bis zum Tode des Organismus (29).

Zu den wichtigsten Mediatorgruppen des zellulären Systems zählen Zytokine, Eicosanoide (Prostaglandine, Leukotriene, Thromboxane) und reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen

Species -ROS). Unter die Zytokine fallen der Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , Interleukine, Chemokine, Interferone (IFN) und „Colony-Stimulating Factors“ -CSF (180).

Besonders TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 sind streng assoziiert mit dem Sepsis Syndrom. Durch z.B. Endotoxin wird eine sequenzielle Freisetzung dieser Zytokine im Sinne einer Zytokinkaskade ausgelöst (25). Eine herausragende Rolle spielt dabei das Zytokin TNF- $\alpha$ . Es ist im Zeitverlauf der Sepsis das erste Zytokin, das im Plasma Spitzenspiegel erreicht (22, 69). TNF- $\alpha$  (Synonym: Cachektin) wird neben dem Endothel und natürlichen Killerzellen vor allem von Monozyten und Makrophagen synthetisiert. Etwa 90 Minuten nach Gabe eines LPS-Bolus konnten sowohl beim Tier als auch beim Menschen maximale Konzentrationen an TNF- $\alpha$  gemessen werden (22, 70). Spezifische Rezeptoren für TNF- $\alpha$  werden auf einer Vielzahl von Zellen gefunden, über die TNF- $\alpha$  sein pleiotropes Wirkungsspektrum vermittelt (25).

Eine generalisierte Wirkung beruht auf der Inhibition der Lipoprotein-Lipase-Aktivität und führt bei längerem Anhalten zur Kachexie. TNF- $\alpha$  kann die Induktion sekundärer Zytokine (z.B. IL-1, IL-6, IL-8) auslösen. Es steigert die Adhärenz von Granulozyten („Polymorphonuclear Neutrophils“ -PMN) an Endothelzellen und die Diapedese von PMN durch die endothelialen Barrieren im umliegenden Gewebe. TNF- $\alpha$  erhöht die prokoagulatorische Aktivität des Endothels und induziert sekundäre inflammatorische Mediatoren wie Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene, PAF, Stickstoffmonoxid und reaktive Sauerstoffspezies (180). Über die Anlagerung so genannter Adaptermoleküle „TNF-R1-Associated Death Domain protein“-TRADD und „Fas-Associated Death Domain protein“-FADD an den TNF-Typ 1 Rezeptor wird die Caspase-8 aktiviert und somit eine Apoptose ausgelöst (152).

IL-1, auch genannt „Lymphocyte Activating Factor“ -LAF oder endogenes Pyrogen, wird von Makrophagen, Monozyten, Endothelzellen, Keratinozyten, neutrophilen Granulozyten und B-Lymphozyten gebildet (125). Es ist eine der vielseitigsten Mediatorsubstanzen des Immunsystems. Es kommt in zwei Formen mit identischer Funktion vor- als IL-1 $\alpha$  und als IL-1 $\beta$ . Es wirkt über spezifische Rezeptoren auf die Zielzellen ein und bewirkt z.B. eine Stimulierung der Lymphozytenproliferation, Fieber und eine Zytokinproduktion von IL-6 und IL-8. Somit haben IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  diverse Funktionen gemeinsam und gehören zu den frühen proinflammatorischen Zytokinen der Sepsis (25). IL-1 $\beta$  fördert gemeinsam mit TNF $\alpha$  die Expressierung von Adhäsionsmolekülen auf Zelloberflächen. Im peripheren Gefäßbett wird

durch IL-1 $\beta$  die Synthese sekundärer Mediatoren wie PAF, Prostaglandinderivate und Nitridoxid induziert (61). IL-1 $\beta$  kann beim Zelluntergang in erhöhter Konzentration im Serum gemessen werden und hat wie TNF- $\alpha$  nur eine kurze Halbwertszeit von 6-10 Minuten. Bei Patienten mit Meningokokkensepsis, septischer Purpura, Kawasakisyndrom und rheumathoider Arthritis konnten erhöhte Plasmakonzentrationen von IL-1 $\beta$  verzeichnet werden (70, 125).

Wie TNF- $\alpha$  ist das IL-6 an der Tumor- und Entzündungskachexie kausal beteiligt (180). LPS, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  stimulieren die Bildung von IL-6 in Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten. IL-6 ist ein wesentlicher Mediator der Akutphasereaktion und wirkt synergistisch mit TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (141, 180). Beim septischen Schock korreliert der Blutspiegel von IL-6 mit der Prognose der Patienten und eignet sich als Marker für den Schweregrad der Erkrankung (33, 163, 189). Auch bei anderen Stressreaktionen, großen Operationen, Verbrennungen und Traumen kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-6, die mit dem Ausmaß des Gewebetraumas korreliert (51, 149). Auf der Oberfläche von PML verursacht IL-6 eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen, die zur Migration der PML in das entzündete Gewebe führen (183). Die Stimulation von Endothelzellen durch IL-6 induziert eine Expression von spezifischen endothelialen Adhäsionsmolekülen (183). Zum einen wirkt IL-6 auf alle Zielzellen, wie z.B. B-Zellen, Hepatozyten und Fibroblasten proinflammatorisch und ist für die klinischen Zeichen des SIRS, wie z.B. Fieber, mit verantwortlich (33). Zum anderen wirkt IL-6 antiinflammatorisch, indem es die endotoxinstimulierte IL-1- und TNF- $\alpha$  Synthese hemmt (2). Daneben stimuliert IL-6 die Produktion von Adrenocorticotropen Hormon (ACTH) und damit die Bildung von Glukokortikoiden, die ebenfalls antiinflammatorische Wirkung besitzen (180).

Ein als antiinflammatorisch geltender Mediator ist das Zytokin IL-10. Es wird vorrangig von T-Helfer-2-Zellen produziert, hemmt T-Helfer-1-Zellen in ihrer Aktivität und wirkt vor allem an B-Zellen, indem es die Expression von „Major Histocompatibility Complex-II“- MHC-II steigert. Außerdem co-stimuliert es das Wachstum von Makrophagen. IL-10 hemmt die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine, vor allem von TNF- $\alpha$  und IL-1 aus Monozyten und Makrophagen. Es reguliert den löslichen Zytokinantagonisten IL-1-Rezeptorantagonist hoch und hemmt die Bildung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase, die für hämodynamische Veränderung mit verantwortlich ist (99, 180). In unserer Studie wählten wir aufgrund der oben beschriebenen Bedeutung in der Sepsis die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-10 aus.

#### 1.1.4.4 Reaktive Sauerstoffspezies

Die Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) stellen weitere wesentliche Mediatoren in der Sepsis dar. Aufgrund der vorausgehenden Aktivierungsvorgänge gehören sie zu den sekundären inflammatorischen Mediatoren (180). Zu ihnen zählen freie Sauerstoffradikale wie Superoxidradikale und Hydroxyradikale und reaktive Sauerstoffverbindungen ohne Radikalcharakter wie Wasserstoffperoxid, Singulett Sauerstoff, hyperchlorige Säure, Ozon und Stickstoffmonoxid (164).

Die Hauptquelle der ROS in der Sepsis sind die Leukozyten (neutrophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen). Ihre Aktivierung stimuliert die membrangebundene „reduzierte Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat“ (NADPH)-Oxidase, die molekularen Sauerstoff zum Superoxidradikal reduziert (respiratory-burst). Das Superoxidanion wird in die Phagozytenvakuolen abgegeben und wirkt bei der Zerstörung von eingeschlossenen Mikroorganismen mit (168). Die Superoxiddismutase (SOD) wandelt die meisten Superoxidradikale in Wasserstoffperoxid um. Wasserstoffperoxid und Superoxidradikale haben nur geringe antibakterielle Wirkungen, sind aber wichtige Vorläufermoleküle von wirksameren Verbindungen. Das Wasserstoffperoxid reagiert mit dem Superoxidanion zu dem hochreaktiven Hydroxyradikal (164).

Die in den azurophilen Granula von Phagozyten befindliche Myeloperoxidase katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid und Chloridionen zum stark bakteriziden Hypochlorid (76). Ein weiterer Reaktionsweg der Superoxidanionen ist die Reaktion mit Stickoxiden, die von Endothel und Leukozyten gebildet werden, zu Peroxynitriden. Diese Peroxynitride zerfallen unter anderem wiederum in Hydroxyradikale (168).

Eine weitere wichtige Quelle für die Entstehung von Sauerstoffradikalen ist das Xanthinoxidase (XO) -Xanthindehydrogenase (XDH)- System. Bei Reoxygenierung von ischämischem Gewebe, wie z.B. dem Intestinum bei Sepsis, gelangt molekularer Sauerstoff in dieses Gebiet. Der in Endothelzellen durch Ischämie vermehrte Anfall der Purinprodukte Hypoxanthin und Xanthin aktiviert das XO-XDH-Enzymsystem. Die XO katalysiert die Reaktion von Hypoxanthin und molekularem Sauerstoff zu Harnsäure. Als Nebenprodukt entstehen dabei Superoxidradikale (164).

Sauerstoffradikale besitzen eine bedeutende Funktion bei der Abtötung von Mikroorganismen und bei der Gewebserneuerung. Sie können jedoch, wenn sie im Übermaß synthetisiert werden, auch eine Reihe negativer Effekte haben. Sie induzieren eine Hydrolyse von Kohlenhydraten, bewirken Funktions- und Strukturänderungen von Proteinen, können zur Oxidation von Nukleinsäuren führen und die „Desoxyribonucleinsäure“ (DNS) Reparationsmechanismen stören. Sauerstoffradikale tragen über eine Stimulierung der Lipidperoxidation zur Membrandestabilisierung bei und können letztendlich zu einem Kapillarleck („capillary-leak-Syndrom“) führen (164).

Bei der Lipidoxidation entstehen stabile Reaktionsprodukte. Diese diffusiblen Moleküle der Lipidoxidation, wie z.B. das Malondialdehyd, können auch fern vom Ort ihres Entstehens Toxizität vermitteln (111).

Durch den oxidativen Stress werden über den Kontakt mit einer Zielzelle eine Reihe von Genen aktiviert („stress response genes“). Dazu gehört die Aktivierung von Kinasenkaskaden, Inaktivierung von Protein-Thyrosin-Phosphatasen oder die Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Dadurch kommt es zur Synthese und Freisetzung von Zytokinen, Antioxidantien und Sauerstoffradikal abbauenden Enzymen. Dies kann zur Reparatur von Zellschäden oder aber, falls das im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion nicht mehr möglich ist, zum gerichteten Zelltod, der Apoptose führen (180). Die anhaltende Mediatorfreisetzung vermittelt eine weitere Leukozytenaktivierung im Sinne eines „circulus vitiosus“ (120).

#### **1.1.4.5 Leukozyten und Leukozyten-Endothel-Interaktion**

Quantitative und qualitative Veränderungen des zirkulierenden Leukozytenpools sind diagnostische Kriterien eines SIRS bzw. einer Sepsis. Eine Zunahme der zirkulierenden Leukozytenzahl kann Folge einer Mobilisierung ruhender wandständiger Leukozyten („marginating pool“) sein. Die Mobilisierung kann z.B. aus der Zunahme des Herzzeitvolumens resultieren. Eine Leukozytose kann durch vermehrte Freisetzung von teilweise unreifen Granulozyten aus dem Knochenmark durch Mediatoren, wie den Interleukinen oder dem CSF induziert werden. Des Weiteren nimmt man eine verzögerte Apoptose der Leukozyten an, die durch den Einfluss von LPS und proinflammatorischen Zytokinen verursacht wird. Eine Leukopenie kann eine gesteigerte Adhäsion am Endothel durch zunehmende Expression von Adhäsionsmolekülen reflektieren oder durch eine Beeinträchtigung der Stammzellreifung im Knochenmark in Frage kommen (17).



Die Leukozyten-Endothel-Interaktion ist ein kontinuierlicher, physiologisch vorkommender Mechanismus, der z.B. bei lokalen Infektionen zur effektiven Herdbekämpfung dient. Durch die systemisch ausgeschütteten proinflammatorischen Mediatoren kommt es zur Adhärenz aktivierter Leukozyten in der terminalen Strombahn. Dabei handelt es sich insbesondere um die Polymorphkernigen Neutrophilen Lymphozyten (PMNL). Die Expression von leukozytären und endothelialen Adhäsionsmolekülen spielt dabei eine ausschlaggebende Rolle (17). Die Migration der Leukozyten erfolgt in Form von Chemotaxis. Chemotaktische Substanzen (z.B. IL-8, Komplementfaktor C5a, Leukotrien B4, PAF) werden von vielen aktivierten Zelltypen, wie z.B. von aktivierte Lymphozyten und Endothelzellen produziert (188).

Während der Sepsis kann es neben Gerinnungsstörungen durch die Abnahme des Blutflusses und damit der Scherkraft in Venolen und Kapillaren sowie durch eine verminderte Verformbarkeit der Leukozyten zu Gefäßthrombosierungen kommen. Die verstärkte Leukozytenadhärenz und die Stase bedingen eine zusätzliche Verlegung terminaler Strombahnen (17, 180). Adhärierende Leukozyten setzen Sauerstoffradikale und Proteasen frei, die zur Schädigung des Gefäßendothels bis hin zur Störung der Mikrozirkulation und zum konsekutiven Organversagen führen können (190).

Unter dem Begriff der Leukozyten-Endothel-Interaktion versteht man im Wesentlichen vier Vorgänge, die die Leukozyten durch LPS, Zytokine und Radikale verstärkt durchlaufen (88, 191):

1. die Leukozytenmarginierung aus der Strommitte,
2. die temporäre Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel („Rolling“),
3. die feste Adhärenz der Leukozyten am Endothel („Sticking“),
4. die Diapedese der Leukozyten durch das Endothel und Migration in das umliegende Gewebe

Das temporäre Interagieren der Leukozyten mit dem Endothel kann als Adhäsion geringer Affinität beschrieben werden. In einer postkapillären Venole mit einem Durchmesser von ca. 30  $\mu\text{m}$  „rollen“ Leukozyten mit einer mittleren Geschwindigkeit von 50  $\mu\text{m/s}$ . Dieses „Rolling“ wird durch eine Familie von Transmembranrezeptoren, die Selektine, vermittelt.

Dazu gehören drei monomere Adhäsionsrezeptoren, die L-, E- und P-Selektine, die alle eine sich gleichende NH<sub>2</sub>-terminale extrazelluläre Domäne besitzen (78).

- L-Selektin steht für „Leukozyten-Selektin“ (Syn: LECAM-1, LAM-1, Mel-14 Antigen, gp90 mel, Leu8/TQ-1 Antigen, CD62L) und ist auf Granulozyten, Monozyten und zirkulierenden Lymphozyten zu finden. L-Selektin bindet die Selektin-Liganden, kann aber auch von P- und E-Selektin gebunden werden, besitzt also Rezeptor- und Ligandenfunktion. L-Selektin ist auch ohne äußere Stimuli reichlich auf oben genannten Leukozyten zu finden. Es spielt eine wichtige Rolle bei dem Lymphozyten-homing in peripheren Lymphknoten. Das Haften („homing“) der Leukozyten an „high endothelial venules“ ist ein physiologischer Prozess in allen lymphatischen Organen des menschlichen Körpers und nicht Zeichen einer Entzündungsreaktion (122, 188).
- P-Selektin steht für „Plättchen-Selektin“ (Syn: PADGEM, GMP-140, CD62P) und wurde ursprünglich auf aktivierten Thrombozyten entdeckt. Später konnte es auch in den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen und in der Granula von Thrombozyten nachgewiesen werden (39). Es wird kurz nach der Stimulation des Endothels durch LPS, TNF- $\alpha$ , oder Wasserstoffperoxid auf dessen Oberfläche exprimiert (121). P-Selektin scheint vorrangig in der Frühphase des Leukozyten-Rollings bedeutungsvoll zu sein. Mäuse mit einem P-Selektin-Expressionsdefizit zeigten erst ca. 1 Stunde nach Auslagerung des Mesenteriums ein Leukozyten-Rolling, welches jedoch geringer war als das der Wildtyp-Mäuse (123).
- E-Selektin steht für Endothel-Selektin (Syn: ELAM-1, CD62E) und wird ausschließlich auf Zytokin- und/oder LPS-aktivierten Endothelzellen exprimiert. In kultivierten humanen Endothelzellen konnte eine maximale Expression dieses Adhäsionsmoleküles erst 4 h nach Aktivierung gefunden werden, die dann 24 Stunden anhielt (24). Granulozyten, Monozyten und einige T-Zellsubpopulationen können E-Selektin binden. Diesem Adhäsionsmolekül wird eine bedeutende Funktion bei der Granulozytenmigration durch aktivierte Endothelzellen zugeschrieben. Weitere alternative Wege werden vermutet, da der Migrationsprozess die Expressionzeitspanne des E-Selektines überdauert (122).

Alle 3 Selektine erkennen und binden spezifische Glykoproteine und/oder Glykolipide, die alle das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis x (sialyl-CD15) enthalten (188). Dieser Ligand wird auf allen zirkulierenden myelogenen Zellen sowie auf zirkulierenden Lymphozyten exprimiert. Sialyl-CD15 agiert vor allem als Ligand für Endothelzellen, deren Oberfläche E- und P-Selektine exprimieren (195).

Daneben wurde das Glykolipid Sulfatid als ein potentieller Ligand für P- und L-Selektine erkannt (122). Das primäre Andocken der Granulozyten an das Endothel wird über Sialyl-CD15 vermittelt, geht dann unmittelbar in eine rollende Bewegung über, bei der sich die Zelle im Blutstrom um die eigene Achse dreht. Dieses Rollen kommt durch eine Vielzahl repetitiver Bindungen zustande, wobei die Scherkraft überwiegt und damit die Bewegung induziert (123).

Im entzündlichen Gewebe führt das Leukozyten-Rolling häufig zu einer festen Adhäsion am Endothel. Diese mit hoher adhäsiver Interaktion haftenden PMNL werden als „Stickers“ bezeichnet. Nach der meist verwendeten Definition sind das Leukozyten, die in postkapillären Venolen für mindestens 30 Sekunden stationär verharren (78). Die Ausbildung einer entgegen der Scherkräfte des Blutstromes stabilen Adhäsion wird durch lokal gebildete Entzündungsmediatoren vermittelt. Diese werden während des Leukozyten-Rollings ausgeschüttet, aktivieren die PMNL, die dadurch Adhäsionsmoleküle aus der Familie der  $\beta$ -Integrine exprimieren. Dabei werden L-Selektine proteolytisch von der Zelloberfläche der Leukozyten abgetrennt (190).

Alle Integrine sind  $\alpha/\beta$  Heterodimere, die sich aus größeren  $\alpha$ -Untereinheiten (120-180 kD) und kleineren  $\beta$ -Untereinheiten (90-110kD) zusammensetzen. Beide Einheiten sind Transmembranproteine, die ihren Hauptteil extrazellulär präsentieren. Bedeutende Subfamilien sind die  $\beta$ 1-(CD29),  $\beta$ 2-(CD18) und die  $\beta$ 3-(CD61) Integrine. Diese Subfamilien bestehen jeweils aus einer variablen  $\alpha$ -Kette (CD11a-c) und einer allen Vertretern gemeinsamen  $\beta$ -Kette (CD18) (98).

Die  $\beta$ 2-Integrine, die ausschließlich auf weißen Blutzellen vorkommen, werden je nach synthetisierenden Zelltypen unterschieden. Auf Lymphozyten werden sie als „Lymphocyte Function Associated Antigen“- LFA-1 (Syn: CD11a/CD18) bezeichnet. Granulozyten sowie Monozyten exprimieren den Mac-1 Rezeptor (Syn: CD11b/CD18) und zusätzlich das p150.95 (Syn: CD11c/CD18) Antigen (187). Die Bedeutung dieser  $\beta$ 2-Integrine wird durch das Krankheitsbild des „Leukocyte Adhesion Deficiency Syndrome“ illustriert. Ursache ist ein

genetischer Defekt des  $\beta 2$ -kodierenden Genes, wodurch es rezidivierend zu Infektionen kommt, die aktivierten Leukozyten aber nicht in der Lage sind, an den Ort des Entzündungsgeschehens zu gelangen. Ein Sticken ist auf Grund dieses Defektes nicht möglich, weshalb sich bei Betroffenen keine Bildung von Eiter zeigt (195).

$\beta 2$ -Integrine werden ständig auf zirkulierenden Lymphozyten exprimiert, ohne dass sie eine Adhäsivität vermitteln. Durch inflammatorische Mediatoren, vor allem Chemokine, werden sie rapide in einen hoch aktivierten Zustand versetzt, der die feste Adhäsion ermöglicht (78). Chemokine werden unter anderem vom vaskulären Endothel synthetisiert, würden aber durch den Blutfluss schnell abströmen. Man vermutet, dass das Rollen der Leukozyten ihnen den längeren Kontakt mit Chemokinen ermöglicht. Die mehrfache Bindung von Chemokinen an Rezeptoren der rollenden Leukozyten induziert über G-Proteine eine innermolekulare Konformationsänderung der Integrine. Dadurch erhöht sich die Bindungsaffinität der  $\beta 2$ -Integrine und es erfolgt eine feste Adhäsion an das Endothel (188).

Die Stimulation des vaskulären Endotheles führt zur Synthesesteigerung von interzellulären Adhäsionsmolekülen, den Integrin-Liganden. Dabei handelt es sich um das Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1, CD54) und ICAM-2. Sie zählen zu einer Superfamilie der Immunglobuline, da sie den Immunglobulinmolekülen ähnlich gefaltete Domänen aufweisen (190). ICAM-1 bindet an die leukozytären  $\beta 2$ -Integrine LFA-1 und an das Mac-1 Antigen. Es besitzt fünf extrazelluläre Immunglobulindomänen, die über einen transmembranen Bereich verankert sind, sowie eine kurze zytoplasmatische Kette, über die es mit dem endothelialen Zytoskelett interagieren kann. Neben dem Endothel kann ICAM-1 noch von einer Vielzahl anderer Zellen exprimiert werden. Ohne Stimulation durch Entzündungsmediatoren ist es nur auf wenigen Zellen zu finden (78, 187). ICAM-2 wird auch ohne Entzündungsreaktion auf Endothelzellen gefunden. Entzündungsmediatoren steigern dessen Synthese nicht. Daher wird ICAM-2 eine Bedeutung bei der Lymphozyten-Rezirkulation zugeschrieben. Es interagiert nur mit dem leukozytären  $\beta 2$ -Integrin LFA-1 (187).

Ein bedeutendes Adhäsionsmolekül für die Leukozyten Rezirkulation der Mukosa ist das „Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1“ (MAdCAM-1). Da es neben Integrinen auch das L-Selektin bindet und somit Leukozyten-Rolling vermittelt, spielt es eine duale Rolle als Integrin- und Selektin-Ligand (188). Letztendlich führt die Interaktion der  $\beta$ -Selektine mit den interzellulären Adhäsionsmolekülen zu einer festen Adhärenz der PMNL an das Gefäßendothel.

Dadurch wird der abschließende Schritt, die transendotheliale Diapedese der Leukozyten, ermöglicht. Eine bedeutende Funktion scheint hierbei das „Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1“ (PECAM-1, CD31) zu spielen. Es wird von Endothelzellen und Leukozyten gleichermaßen konstitutiv gebildet. Bestimmte Bereiche des PECAM-1-Moleküles regulieren die transendotheliale Diapedese und die nachfolgende Wanderung der Leukozyten durch die extrazelluläre Matrix (190).

#### **1.1.4.6 Endothelschädigung und Plasmaextravasation**

Die Extravasation von Plasma bei Endotoxinämie äußert sich im gesteigerten Lymphabfluss und bei einer Überschreitung der Transportkapazität der Lymphgefäße konsekutiv in einem Ödem. Das Ausmaß der Extravasation hängt dabei von der Gefäßoberfläche, der Wandpermeabilität und dem intravasalen Druck ab (193).

Die Permeabilitätssteigerung des Endotheles im Rahmen eines Entzündungsgeschehens betrifft vorwiegend die Kapillaren und postkapillären Venolen. Eine Vielzahl von Mediatoren wie z.B. Serotonin, Histamin, Arachidonatabkömmlinge, Komplementfaktoren, Plättchenaktivierungsfaktoren, Zytokine und Toxine, verursachen und verstärken diese pathologische Permeabilitätssteigerung (162). Das „capillary-leak-Syndrom“ ist ein typisches Erscheinungsbild der Endothelschädigung bei der Sepsis. Unter einem „capillary-leak-Syndrom“ versteht man den Austritt von intravaskulärer Flüssigkeit in den interstitiellen Raum (105).

Die Endothelzellen der postkapillären Venolen besitzen myosinhaltige kontraktile Eiweiße. Unter dem Einfluss von Entzündungsmediatoren können sie sich kontrahieren. Dadurch entstehen Lücken zum einen zwischen den interendothelialen Zellkontakten und zum anderen innerhalb der Venolenbasalmembran. Durch entzündungsauslösende Toxine, wie z.B. das Endotoxin, kann es direkt zur Schädigung des Endotheles kommen. Im geringfügigsten Falle äußert sich diese Schädigung nur in einer reversiblen Auflockerung der Zona occludens. Später kann auch ein apikales Zellödem, verbunden mit einer Mikrovillosität der lumenseitigen Zellmembran auftreten. Schließlich bilden sich unter dem Endothelbelag Blasen, so dass die geschädigten Endothelzellen aus ihrem rohrartigen Verband mit dem Blutstrom herausgerissen und abtransportiert werden. Diese entzündungsbedingte Veränderung der Gefäßmembran führt zum Anhaften von Thrombozyten und Granulozyten (162).

Während eines Entzündungsgeschehens tragen hämodynamische Faktoren zusätzlich zu einer Permeabilitätssteigerung bei. Die lokale Erhöhung des intravasalen Druckes, hervorgerufen durch gesteigerte Durchblutung, führt zur Exsudation (180). Die Exsudation bewirkt zusammen mit der proteolytischen Veränderung der Interzellulärsubstanz eine Gewebeschwellung. Das eiweißreiche Exsudat verdünnt somit lokal die Konzentration entzündlicher Substanzen. Außerdem ermöglicht sie den Antransport von Antikörpern. Ferner wird durch das im Gewebe gebildete Fibrin der entzündliche Schaden abgegrenzt und die Erreger können an die Fibrinfäden fixiert werden. Auf der anderen Seite ist diese Ödemflüssigkeit ein sehr gutes Nährmedium für die Erreger selbst, die sich dadurch weiter vermehren können (162).

Das Endothel spielt, neben der Synthese von Entzündungsmediatoren, eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Gerinnungssystems und bei der Aufrechterhaltung der Hämostase. Die sepsisbedingte Schädigung des Endothels hat zur Folge, dass diese Funktionen nicht mehr effektiv ausgeführt werden können (180).

Auch wenn während Endotoxinämie die Extravasation in fast allen Geweben nachweisbar ist, wird der Gastrointestinaltrakt bzw. der Dünndarm als ein Hauptort für diesen Prozess angesehen (193). Daneben führt der mit der Extravasation verbundene intravasale Flüssigkeitsverlust, kombiniert mit der hämodynamischen Konstellation während der Sepsis, zu kardiogenen Funktionsstörungen. Die respiratorische Situation wird durch ein interstitielles Lungenödem verschlechtert. Die Nieren werden durch den Volumenmangelzustand in ihrer Funktion beeinträchtigt. Daher ist die Behandlung des Ödems in der Therapie der Sepsis eines der grundlegenden Therapieprinzipien (180).

### **1.1.5 Bedeutung des Intestinums für die Pathogenese der Sepsis**

Die bedrohlichste Komplikation des SIRS oder der Sepsis stellt das Multiorganversagen dar. Mit einer Inzidenz von 10-25% und einer Letalität von 50-70% stellt es die häufigste zum Tode führende Komplikation nach schweren Traumen dar (82). Beim Multiorganversagen, z.B. in Folge der Sepsis, kommt es zur Zentralisation des Kreislaufes, das heißt, zu einer Perfusionsumverteilung zu Gunsten der Vitalorgane Gehirn und Herz. Dieser zunächst sinnvolle Regulationsmechanismus kann bei längerem Fortbestehen zu einer Gefahr für den Gesamtorganismus führen. Auf Grund seiner hohen Dichte an  $\alpha$ -1-Rezeptoren gehört der Darm im Rahmen der sympathikoadrenergen Reaktion während eines traumatisch-hämorrhagischen oder septischen Schockes zu den primär minderperfundierten Organen. Der daraus resultierenden

intestinalen Ischämie und der damit verbundenen Störung der natürlichen Darmbarriere wird eine bedeutende Rolle in der Genese des Multiorganversagens zugeschrieben (82). Der Darm wird damit als „Motor des Multiorganversagens“ betrachtet und als „undrained abscess of multiple organ failure“ charakterisiert (48, 129).

Der anatomische Aufbau des Intestinum prädisponiert zur frühen Schadensnahme im septischen Schock. Im Normalzustand stellt die Darmschleimhaut eine sehr effektive Barriere gegen enterale Mikroorganismen da. Das Gegenstromprinzip im Bereich der Mukosa spielt in der Pathogenese der Sepsis eine entscheidende Rolle. Die zentrale Villusarterie verzweigt sich erst in der Zottenspitze, zu ihr parallel verläuft das venöse System. Damit tritt bereits an der Zottenbasis auf Grund des hohen  $O_2$ -Gradienten ein starker  $pO_2$ -Abfall im arteriellen Blut auf (205). Eine Ischämie der Zottenspitze bei einem kritischen Blutdruckabfall ist die Folge. Reaktiv bildet sich ein Ödem in der Lamina propria, welches schließlich zu einer Epithelnekrose führen kann (126).

Kommt es nun zu einer Reperfusion, wird mit der Anlieferung von Sauerstoff über eine Aktivierung der XO Xanthin zu Hypoxanthin umgewandelt. Dabei entstehen Sauerstoffradikale und es erfolgt eine Aktivierung von Proteasen bzw. neutrophilen Granulozyten. Dies führt wiederum zu einer weiteren Schädigung der Darmmukosa (77, 79). Durch die intestinale Ischämie kommt es zu Läsionen in der Darmmukosa, wodurch die wirkungsvolle Barriere gegen Mikroorganismen bzw. gegen ihre Bestandteile aufgehoben wird. Die Permeabilität der Darmmukosa steigt. Histologisch spricht man vom durchlässigen Darm -„leaky-gut“ (66, 82, 84).

Der Verlust der Darmbarriere und die daraus resultierende Ausbreitung von Bakterien bzw. ihrer Bestandteile ist als „bacterial translocation“ -bakterielle Translokation- definiert (19). Eine Verletzung der natürlichen Darmbarriere in Folge intestinaler Ischämie führt zu einer Aktivierung des GALT („Gut Associated Lymphatic Tissue“). Mit 50-70 % der lymphoiden Zellen stellt dieses Darm-assoziierte lymphatische Gewebe eines der umfangreichsten lymphatischen Gewebe des menschlichen Körpers dar. Durch ein massives Einwirken von antigenen Strukturen (z.B. LPS), die positive Rückkopplung der humoralen und zellulären Systeme sowie durch die Beeinträchtigung von Kontrollmechanismen resultiert eine Agravierung des Sepsisgeschehens in Form einer „Mediatorexplosion“ (55, 82).

Für die Beurteilung der Darmperfusion stehen in der Klinik verschiedene Indikatormessungen zur Verfügung. Neben der Endoskopie, der Angiographie, der Katheterisierung der Lebervene, der Dopplersonographie und der Bestimmung von biochemischen Serummarkern, wurde auch die tonometrische Messung des intramukösen instestinalen pH-Wertes ( $\text{pH}_i$ ) zur Messung der Darmperfusion verwendet (82). Unter der Annahme, dass die Hydrogencarbonat- ( $\text{HCO}_3^-$ ) Werte im Gewebe und im arteriellen Blut vergleichbar sind, kann mittels der Henderson-Hasselbach-Gleichung aus dem Kohlendioxidpartialdruck der  $\text{pH}_i$ -Wert berechnet werden. Das messende Tonometer liegt dabei nahe der Spitze einer Sonde direkt der Magen- oder Darmwand an (83). Eine Azidose im Bereich der Darmmukosa wird als einer der frühesten Indikatoren einer intestinalen Ischämie angesehen (82).

Eine kombinierte Messung von arteriellem Laktat und  $\text{pH}_i$  stellt einen prädiktiven Wert für das Outcome der Patienten dar. In einer klinischen Studie von Friedmann et al. wurden im Verlauf von 24 Stunden nach Aufnahme auf die Intensivstation der  $\text{pH}_i$ -Wert und die arterielle Laktatkonzentration gemessen. Nach 24 Stunden erreichten diese Parameter eine Spezifität von 100% für die Mortalität, die Sensitivität lag bei 44% (72). Bei der Messung des  $\text{pH}_i$ -Wertes werden allerdings nicht-respiratorische Störungen des arteriellen Säure-Basen-Status in die Tonometrie mit einbezogen, was zu ungenauen Ergebnissen führt. Neuere Untersuchungen favorisieren für die Messung der gastrointestinalen Durchblutung die mukosal-arterielle  $\text{CO}_2$ -Differenz - $\text{pCO}_2$ -Gap (201). Exakte Perfusionsbestimmungen des gesamten Gastrointestinaltraktes können mit der Lebervenenkatheterisierung vorgenommen werden. Daneben kann mit Hilfe der Plasma-Disappearance-Rate des Farbstoffes Indozyaningrün ( $\text{PDR}_{\text{ICG}}$ ) nicht-invasiv die Leberperfusion und -funktion bestimmt werden (107). Therapeutische Ansätze zur Darmprotektion liegen in der frühen Schocktherapie, einer kausalen Beeinflussung der intestinalen Ischämie, in früher enteraler Ernährung, Immunonutrition und selektiver Darmdekontamination (82).



## 1.2 Therapiekonzepte bei Sepsis

Die konventionelle Therapie der Sepsis beruht auf folgenden Grundsäulen (109, 160):

### **Kausale Therapie:**

Fokussuche und Fokussanierung,  
Adäquate Antibiotikatherapie

### **Supportive Therapie:**

Frühzeitige Kreislaufstabilisierung (differenzierte Volumen- und Katecholamingabe),  
Frühzeitige Beatmung,  
Erhaltung der Homöostase,  
Nierenersatztherapie,  
Frühzeitige parenterale Ernährung

### **Adjunktive Therapie:**

Aktiviertes Protein C (Drotrecogin alfa),  
Niedrig dosiertes Hydrocortison

Im Oktober 2002 wurde anlässlich des Jahreskongresses der „European Society for Intensive Care Medicine“ (ESICM) in Barcelona die „Barcelona Declaration“ verabschiedet, woraus im März 2004 die „Surviving Sepsis Campaign Guidelines (SSC) for Management of Severe Sepsis and Septic Shock“ hervorgingen (59). Mit diesen Guidelines stehen durch mehr als 30 internationale Experten konsentierten Leitlinien zum klinischen Umgang mit septischen Patienten zur Verfügung. Die Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und die Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) haben in Anlehnung an die internationalen Empfehlungen der SSC-Guidelines Leitlinien erarbeitet, die die Versorgungsstruktur im deutschen Gesundheitssystem berücksichtigen. Folgende Leitlinienthemen wurden als vorrangig eingestuft:

- a) Diagnose,
- b) Prävention,
- c) kausale Therapie,
- d) supportive Therapie,
- e) adjunktive Therapie.

Die Leitlinien sind nach einem sorgfältig geplanten und streng eingehaltenen Prozess nach den Vorgaben der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) erstellt worden. Dabei wurden die Leitlinien gemäß den Empfehlungen des „Oxford Centre of Evidence Based Medicine“ in Evidenzgrade I-V eingeteilt. Gemäß der Evidenzgrade können für eine bestimmte Fragestellung Empfehlungen mit Empfehlungsgraden von A)-E) ausgesprochen werden. Entsprechend wird der Evidenzgrad der Studie benannt, die zu dem entsprechenden Empfehlungsgrad geführt hat (159).

In der adjunktiven Sepsistherapie ließ das rekombinante humane aktivierte Protein C erstmals Hoffnung auf ein spezifisches Medikament zur Behandlung der schweren Sepsis aufkommen. Protein C ist einer der Hauptregulatoren der Gerinnung, der die geschwindigkeitsbestimmenden Faktoren der Gerinnungskaskade, Faktor Va und Faktor VIIIa, inaktiviert. Zusätzlich hat Protein C profibrinolytische Eigenschaften. Es kann die Bildung intravasaler Thromben verhindern und fördert die Fibrinolyse und damit die Rekanalisierung eines thrombotisch verschlossenen Gefäßes. Protein C vermag die Adhäsion von Leukozyten am Endothel und die Freisetzung von IL-1 und TNF- $\alpha$  durch Monozyten zu blockieren. Dadurch kann die systemische Ausbreitung von einer primär lokalisierten Entzündung gebremst werden (105). In der PROWESS- (Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis) Studie, einer doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie aus dem Jahr 2001, zeigte sich eine absolute Risikoreduktion der Sterblichkeit von 6,1% durch Drotrecogin alfa (aktiviertes Protein C). Seit 2002 ist dieses Medikament zur Therapie erwachsener Patienten mit schwerer Sepsis zugelassen (21). In den Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft wird allerdings nur ein Empfehlungsgrad B (Evidenzgrad Ib) für Drotrecogin alfa ausgesprochen, da eine weiterführende Analyse der Prowess-Daten ergab, dass Patienten mit niedrigem Schweregrad einer schweren Sepsis unter der Behandlung eine erhöhte 1-Jahres-Letalität aufwiesen (159). Die meisten adjunktiven Therapieansätze mit Immunmodulatoren (z.B. Immunglobuline, anti-TNF-Antikörper, löslicher TNF-Rezeptor, Antibradikinin, antiinflammatorisches IL-10, IL-1-Rezeptorantagonist, Interferon- $\gamma$ ), Prostaglandinhemmern und der Einsatz von Gerinnungsinhibitoren (z.B. Antithrombin-III) befinden sich noch in der klinischen Prüfung und erbringen nur zum Teil den erhofften Erfolg (110, 145).

Auch unsere Arbeit beschäftigt sich mit einem potenziell adjunktiven Therapieansatz bei der Behandlung der Sepsis. Es wurde der Einfluss von 2 Antioxidantien auf die Mikrozirkulation bei

Endotoxinämie untersucht. Dabei handelt es sich um N-Acetylcystein und Tirilazad Mesylat, die in Kombination verabreicht wurden. N-Acetylcystein wird bereits in den Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft unter dem Punkt „adjunktive Therapie- andere Therapieansätze“ erwähnt. Allerdings mit dem niedrigsten Grad der Empfehlung- Grad E, da für diesen Therapieansatz ein Behandlungsvorteil noch nicht nachgewiesen werden konnte (159).

Unsere Untersuchung stellt daher einen weiteren Beitrag dar, den im Pathomechanismus der Sepsis durchaus sinnvollen Einsatz von N-Acetylcystein bzw. Tirilazad Mesylat zu untersuchen. Dem Organismus stehen wirksame Schutzmechanismen gegenüber radikalischer Belastung zur Verfügung. Dabei handelt es sich um endogene, antioxidativ wirksame Substanzen im Gewebe, die sich in 4 Gruppen untergliedern lassen (76):

1. Verbindungen mit einem niedrigen Molekulargewicht (z.B. Vitamin C, E,  $\beta$ -Carotin)
2. Sulfhydrylgruppendonatoren (z.B. Glutathion)
3. Proteine mit Sulfhydrylgruppen
4. Enzyme (z.B. SOD)

Sind die Schutzmechanismen unzureichend ausgebildet oder durch vermehrte Radikalbildung überlastet, wird der Organismus geschädigt. Aus verschiedenen In-Vivo-Studien ist bekannt, dass durch die Applikation von Bakterien oder LPS eine verstärkte Bildung von ROS induziert wird. Vor allem im Dünndarm, im Magen, in der Lunge und in der Leber konnten erhöhte Konzentrationen von ROS gemessen werden (135, 139, 198). Die Plasmakonzentration der antioxidativen Vitamine A, C, E und  $\beta$ -Carotin sind bei septischen Patienten erniedrigt. Daneben konnte ein Konzentrationsabfall der protektiven Enzymsysteme (SOD, Katalase, Glutathionperoxidase) im Muskelgewebe gemessen werden. Im Plasma und in den Erythrozyten von septischen Patienten wurden erhöhte Konzentrationen von Katalase und SOD festgestellt (164).

Therapeutisch bestehen 2 prinzipielle Möglichkeiten, radikalische Belastung des Organismus zu verringern. Zum einen kann man versuchen, die Radikalbildung z.B. durch Anhebung des endogenen Antioxidantienstatus oder durch Hemmung radikalbildender Enzyme zu inhibieren. Zum anderen kann man Radikalfänger („radical scavenger“) in Form von Sauerstoffradikalabbauenden Substanzen einsetzen (164). Als Beispiel für die erste Option ist das in dieser Untersuchung eingesetzte N-Acetylcystein (NAC) zu nennen. Über den zweiten Weg wirkt das Tirilazad Mesylat (TM).

## **1.3 N-Acetylcystein**

### **1.3.1 Allgemeines**

NAC ist ein Schwefel enthaltendes Derivat der Aminosäure Cystein, welche natürlicherweise in Nahrungsmitteln vorkommt. Die Entdeckung, dass NAC ein wirksames Antidot gegen die Acetaminophen- (Metabolit von Paracetamol) Vergiftung ist, gab den ersten Hinweis auf die Wichtigkeit des NAC als Antioxidans (20). Daneben ist NAC seit Jahren als wirksames Mukolytikum bekannt.

### **1.3.2 Pharmakokinetik**

Oral verabreicht wird NAC schnell und vollständig resorbiert. Im Organismus findet es sich teils in freier Form, teils reversibel über Disulfidgruppen an Plasmaproteine gebunden. Es lokalisiert sich vor allem in der Leber, den Nieren, den Lungen sowie im Bronchialschleim. NAC wird in der Darmwand und bei der ersten Leberpassage zu Cystein deacetyliert.

Neben kleinen Mengen Taurin und Sulfat sind die beiden Hauptmetabolite Cystin und Cystein. Ca. 30% der verabreichten Dosis werden direkt renal ausgeschieden. Über den Mechanismus nicht-renaler Elimination liegen keine Untersuchungen vor.

### **1.3.3 Pharmakodynamik**

NAC stellt durch Cystein einen essentiellen Vorläufer der Glutathion-Synthese zur Verfügung. Dadurch erhöht es die endogenen Vorräte an Glutathion. Glutathion vermittelt eines der wichtigsten nukleophilen und antioxidativen Wirkprinzipien des Organismus. Glutathion kann die bei bestimmten Intoxikationen entstehenden toxischen, reaktiven, elektrophilen Metaboliten durch Bildung von inerten Komplexen inaktivieren. Elektrophile Verbindungen werden durch Konjugation inaktiviert, oxidierende Verbindungen durch Reduktion neutralisiert.

NAC kann durch die intrazelluläre Erhöhung der Glutathionkonzentration die endogene Antioxidantienkonzentration steigern, Wasserstoffperoxid und andere Hydroxyradikale direkt abfangen und so dem oxidativen Stress entgegenwirken (164, 204).

NAC, Cystein und Glutathion enthalten Schwefel in der Form der Schwefel-Hydryl-Gruppe. Die mukolytische Wirkung des NAC beruht auf der Eigenschaft der Sulfhydrylgruppen, die Disulfidbrücken der Mukoproteine des Schleimes zu reduzieren. Dadurch verringert sich die Schleimviskosität (117).

### **1.3.4 Klinische Anwendung/Effekte**

NAC findet hauptsächlich klinische Anwendung bei der Behandlung akuten Paracetamol-Vergiftungen und bei Leberversagen nach Paracetamol-Vergiftungen. Paracetamol wird bei hoher Dosierung in der Leber über das Cytochrom-P450-System metabolisiert. Dabei entsteht ein toxischer Metabolit, der mit Glutathion reagiert. Durch Umwandlung in eine Mercaptursäurekonjugat wird dieser Metabolit über die Niere ausgeschieden. Nach der Einnahme von sehr hohen Mengen von Paracetamol wird ein weiterer, sonst ungenutzter Stoffwechselweg eingeschlagen. Dadurch kommt es zur Arylierung von Zellproteinen in der Leberzelle. Dosisabhängig entsteht eine Leberzellschädigung bis hin zur Leberzellnekrose. NAC kann durch seine oben beschriebenen Eigenschaften bei rechtzeitiger Gabe diesen pathologischen Vorgang verhindern oder aufhalten (117). Bei Vergiftungen durch Acrylnitril, Methacrylnitril und Methylbromid kommt NAC ebenfalls als Antidot zum Einsatz. Des Weiteren ist NAC ein bekanntes Mukolytikum bei der Behandlung akuter und chronischer Erkrankungen des Respirationstraktes (151).

## **1.4 Tirilazad Mesylat**

### **1.4.1 Allgemeines**

TM gehört zu der Gruppe der Lazaroide. Das sind Substanzen mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften, deren Name auf einem Paradigma beruht. Wie in der Bibel nachzulesen ist, ernährte sich der Bettler Lazarus von den Abfällen, die von der Tafel der reichen Prasser herab fielen (Lukas 16, 19-31). Bei der biochemischen Zersetzung im Rahmen des ischämiebedingten Zellunterganges, insbesondere in der Phase der Reperfusion, kommt es zu einer Anhäufung von freien Radikalen. Diese verursachen und beschleunigen den nekrotisierenden Effekt der Ischämie und führen letztendlich zum Zelltod. Lazaroide binden diese Radikale und können dadurch die ischämische Zellnekrose auf verschiedenen Entwicklungsstufen eindämmen (140).

Im übertragenen Sinn sind die freien Radikale die Abfallprodukte von denen sich die Lazaroide „ernähren“. Die Muttersubstanz der Lazaroide (21-Aminosteroid) sind die Glukokortikoide. Durch den Ersatz der Kohlenstoffgruppe 21 des Sterangerüsts durch Aminogruppen entfällt die rezeptorspezifische Aktivität.

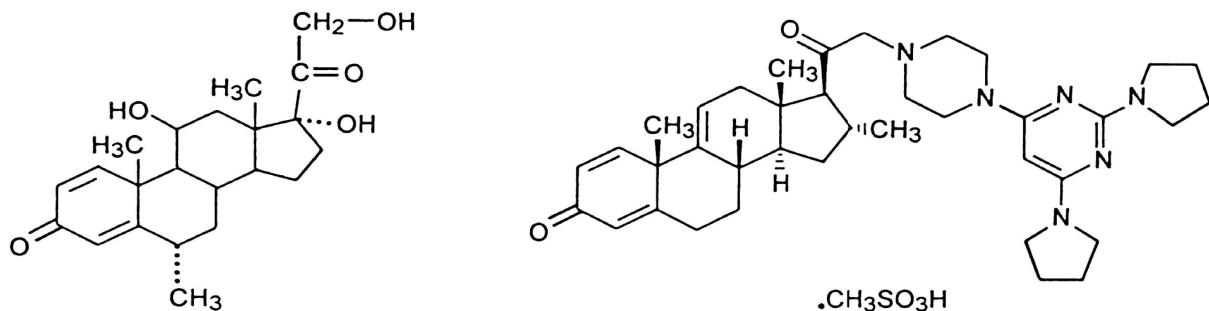


Abbildung 1:  
Glukokortikoid 6a-Methylprednisololon (links), 21-Aminosteroid U-74389G (rechts)

Glukokortikoide vermitteln ihre Wirkung entweder über einen Kernrezeptor (genomische Wirkung), oder spezifisch über Membranrezeptoren bzw. unspezifisch durch physikochemische Wechselwirkungen mit Membranen (nicht-genomische Wirkung). Mit den Lazaroiden wurden bewusst Substanzen entwickelt, die durch die unspezifische Membranwirkung und nicht über Rezeptoren wirken. Dadurch fehlt eine diabetogene Wirkung. Lazaroide haben keinen Effekt auf die Mitogen-stimulierende Zytokinproduktion und bewirken daher auch keine rezeptorvermittelte Immunsuppression (46).

#### 1.4.2 Pharmakokinetik

TM ist bei gesunden Patienten zu 99% an Plasmaproteine gebunden. Bei der Verstoffwechslung entstehen zwei Metabolite, das U-89678 in höherer und das U-87999 in geringerer Konzentration. TM wird in der Leber metabolisiert und zu ca. 80% biliär/fäkal eliminiert.

### **1.4.3 Pharmakodynamik**

TM bewirkt eine Membranstabilisierung durch eine verminderte Membranfluidität. Diese Membranstabilität verhindert ein Voranschreiten der Lipidoxidation, indem die Beweglichkeit von Lipidperoxyl- und Lipidalkoxyradikale innerhalb der Membran reduziert wird. Lazarole binden insbesondere Lipidperoxyl- und Phenoxyradikale und können dadurch einer möglichen Gewebeschädigung entgegenwirken. TM trägt dazu bei, dass der Gehalt der Zellmembran an Vitamin E, dem wichtigsten endogenen lipidlöslichen Antioxidans, erhalten bleibt. TM besitzt eine hohe Affinität zum Endothel. Dadurch schützt es die Endothelzellfunktionen, wie z.B. die Permeabilität, vor einer Störung durch Sauerstoffradikale (46).

### **1.4.4 Klinische Anwendung / Effekte**

Eines der ersten klinisch untersuchten Lazarole war U-72099E, ein Non-Glukokortikoid mit antioxidativer Wirkung im Hochdosisbereich. Es wurde in ZNS-Trauma-Studien untersucht und führte durch Weiterentwicklung zu potenteren 21-Aminosteroiden, wie dem U-74006 (Tirilazad Mesylat). Inzwischen gibt es noch wirksamere 21-Aminosteroide wie das U-72099E. Diese Substanz wurde wegen galenischer Probleme und zu schneller Elimination in vivo bisher jedoch noch nicht pharmazeutisch verwendet (85, 86). Klinische Anwendungen findet TM unter dem Präparat Freedox<sup>®</sup>, ein Medikament im Einsatzbereich „ZNS-aktive Substanzen“. Die Indikation beschränkt sich auf aneurysmal bedingte Subarachnoidalblutungen bei männlichen Patienten. Die pharmakologische Wirkung von TM äußert sich in einer Begrenzung des Ausmaßes sekundärer Gewebsschädigungen. Daneben nimmt die Häufigkeit bzw. Stärke zerebraler Vasospasmen ab.

## **1.5 Ergebnisse bisheriger Forschungen**

### **1.5.1 N-Acetylcystein**

#### **1.5.1.1 Experimentelle Untersuchungen**

In tierexperimentellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass NAC bei septischen Tieren die Freisetzung von  $\text{TNF-}\alpha$ , die Aktivierung proinflammatorischer Zytokine und die zelluläre Apoptose inhibiert. Daneben konnte Gewebeerstörung, induziert durch IL-1, verhindert werden (151, 202). In einem Endotoxinmodell am Schaf wurde die inhibierende Wirkung von NAC auf die Granulozytenaggregation festgestellt (20). Die Leukozytenadhäsion und die vaskuläre Permeabilität in postkapillaren Venolen des Mesenteriums von Ratten waren unter der Behandlung mit NAC während Endotoxinämie geringer, als bei unbehandelten Tieren (175). Eine Studie an endotoxämischen Hunden, deren Femoral- und Pulmonalarterien, die Vena mesenterica superior und Vena renalis, sowie das Perikard katheterisiert wurden, ergab, dass durch die Gabe von NAC der verminderte kardiale Index, sowie der erhöhte systemische und pulmonale Widerstand gesteigert bzw. verringert werden konnten. Des Weiteren konnte in diesem Versuch durch die NAC-Gabe eine verminderte Freisetzung von  $\text{TNF-}\alpha$  und eine erhöhte Aktivität der Glutathionperoxidase verzeichnet werden (204). NAC scheint daneben eine antikoagulative Wirkung zu besitzen (76).

#### **1.5.1.2 Klinische Untersuchungen**

Die Gabe von NAC bei septischen Patienten mit einem „Acute Respiratory Distress Syndrom“ (ARDS) ergab eine Verbesserung der pulmonalen Hypertension, des Herzindex und der Sauerstoffanlieferung (164). In unterschiedlichen klinischen Studien konnte die antioxidative Wirkung von NAC bestätigt werden. Es wurde eine erhöhte Antioxidantienkapazität und ein verminderter oxidativer Stress durch einen verbesserten Thiolredoxstatus und eine gesteigerte Konzentrationen von Glutathion in der Bronchoalveolarflüssigkeit nachgewiesen. Des Weiteren konnte durch NAC die Chemotaxis humaner Neutrophilen und Monozyten inhibiert werden. Der oxidative Metabolismus zur Neutralisierung der hyperchlorigen Säure und der Hydroxyradikale durch neutrophile Myeloperoxidase nahm ab (151). Spies et al. konnten in einer randomisierten prospektiven doppelblinden Studie eine verbesserte Gewebsoxygenation durch die Gabe von 150 mg/kg/h NAC über 15 Minuten, gefolgt von 12,5 mg/kg/h NAC-Dauerinfusion über 90 Minuten, feststellen. 58 septische Patienten erhielten einen Radialis- und Pulmonalkatheter, daneben erfolgte eine tonometrische Messung des intramukosalen intestinalen pH-Wertes ( $\text{pH}_i$ ).



Spies et al. konnten eine erhöhte  $VO_2$ , einen erhöhten  $pH_i$ , einen verminderten venös-arteriellen  $pCO_2$ , sowie ein erhöhtes Überleben von 69% bei NAC-Respondern (45%) nachweisen. Über 50% der Studien-Patienten waren NAC-Non-Responder, was zu der Vermutung führte, dass NAC wahrscheinlich nur in der frühen Phase der Sepsis wirkt (186). In einer weiteren randomisierten prospektiven doppelblinden Studie von Rank et al. konnte mit Hilfe der tonometrischen Messung des  $pH_i$ , der Katheterisierung der Lebervene und der Untersuchung der Plasma-Disappearance von Monoethylglycinexylidid ( $PDR_{MEGX}$ ) eine verbesserte Leberperfusion und eine verbesserte Leberfunktion durch die Bolusgabe von 150 mg/kg/h NAC, gefolgt von einer kontinuierlichen NAC-Gabe von 12,5 mg/kg/h über 90 Minuten, beobachtet werden (157). Ein kürzlich veröffentlichter Fallbericht von Hein et al. 2004 bestätigte dies in einer weiteren Untersuchung der Leberfunktion an fünf septischen Patienten (93).

## **1.5.2 Tirilazad Mesylat**

### **1.5.2.1 Experimentelle Untersuchungen**

In einem Cecal Ligation and Puncture- (CLP) Sepsis-Modell an Ratten konnte durch die Behandlung mit 3 mg/kg/h TM über vier Stunden eine verbesserte Überlebensrate nach 72 Stunden erreicht werden (154). Experimentelle Untersuchungen an endotoxämischen Hunden, bei denen die Femoral- und Pulmonalarterien, die Vena mesenterica superior und Vena renalis, sowie das Perikard katheterisiert wurden, ergaben, dass durch die Bolusgabe von 80  $\mu$ g/kg TM, gefolgt von einer Dauerinfusion von TM von 10  $\mu$ g/kg/h über drei Stunden, eine verminderte Freisetzung von  $TNF-\alpha$ , ein verbesserter renaler und mesenterialer Blutfluss, sowie eine verbesserte kardiale Funktion erreicht werden konnten (204).

In diversen Ischämie/Reperfusionsmodellen konnte gezeigt werden, dass Lazaroide eine protektive Wirkung auf das Endothel haben und in der Lage sind, die Akkumulation von Leukozyten im Gewebe zu reduzieren (49, 63, 96). Daneben scheint TM die gesteigerte Synthese von Eicosanoiden und  $TNF-\alpha$  bei Endotoxinämie zu supprimieren (182, 204).

Weitere tierexperimentelle Studien beschäftigen sich mit dem Einsatz von TM beim akuten Lungenversagen. In der Transplantationsmedizin konzentrieren sich die Forschungsvorhaben derzeit auf die Optimierung der Lagerungs- und Transportbedingungen einschließlich der zusätzlichen Anwendung von Antioxidantien. Einzelne Berichte über positive Effekte von

Lazaroiden bei Tumoren, neurodegenerativen und demyelinisierenden Erkrankungen liegen vor. Ein eventueller Einsatz bei der Behandlung entzündlich rheumatischer Erkrankungen wird ebenfalls in Erwägung gezogen (46).

### **1.5.2.2 Klinische Untersuchungen**

In der National Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS III) wurde an 499 Patienten mit akuter Rückenmarksverletzung die Wirksamkeit der therapeutischen Gabe von Methylprednisolon mit dem therapeutischen Erfolg von TM verglichen. Wurde TM 0 bis 3 Stunden nach dem Trauma eingesetzt, ergab sich eine vergleichbar gute Wirkung wie beim Methylprednisolon (46). TM wurde für die klinische Entwicklung ausgewählt und vorrangig bei der Behandlung von akuten Gehirn- und Rückenmarksverletzungen sowie von Schlaganfällen geprüft (85). In experimentellen Untersuchungen zeigte dieses 21-Aminosteroid auch protektive Effekte bei fokaler und globaler Ischämie sowie bei der Behandlung von Subarachnoidalblutungen.

Eine klinische Studie ergab, dass es unter 6 mg/kg/Tag TM zu einer Begrenzung des Ausmaßes sekundärer Gewebsschädigungen kommt und die Häufigkeit bzw. Stärke zerebraler Vasospasmen abnimmt. TM ist seit 1995 als Therapeutikum für aneurysmal bedingte Subarachnoidalblutungen bei männlichen Patienten zugelassen. Bei weiblichen Patienten zeigte die oben genannte, in klinischen Studien geprüfte Dosierung keine Wirksamkeit. Man vermutet, dass bei jüngeren Frauen auf Grund metabolischer Gegebenheiten höhere Dosen notwendig sind (46). Klinische Untersuchungen des Einsatzes von TM bei Sepsis-Patienten liegen bisher nicht vor.

## 2 Herleitung der Aufgabenstellung

Im Mittelpunkt dieser Untersuchung stand die mesenteriale Mikrozirkulation bei Endotoxinämie, da die mesenteriale Mikrozirkulation neben der intestinalen eine ausschlaggebende Rolle für die Genese und den Verlauf des septischen Multiorganversagens einnimmt. Die Verbesserung der Mikrozirkulation führt zu einer Stabilisierung des Gesamtzustandes.

Wichtige Mediatoren bei der Pathogenese der Sepsis sind die freien Sauerstoffradikale. Der Einsatz von Antioxidantien könnte daher eine sinnvolle Therapiestrategie sein.

Zunächst wurden die Substanzen N-Acetylcystein und Tirilazad Mesylat in Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe unter dem gleichen Versuchsaufbau bei Einzelgabe getestet. Veröffentlichte Ergebnisse liegen dazu noch nicht vor, lassen aber auf positive Effekte auf die mesenteriale Mikrozirkulation schließen, insbesondere auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion und die Plasmaextravasation. Sie stellen pathogenetisch für die Sepsis entscheidende Prozesse der Mikrozirkulation dar. Neben diesem Aspekt und den beschriebenen klinischen Untersuchungsergebnissen der beiden Substanzen wurden sie in unserem Versuchsaufbau kombiniert eingesetzt und die Veränderung in der mesenterialen Mikrozirkulation untersucht.

Explizit wurde die Beeinflussbarkeit der Leukozyten-Endothel-Interaktion und der Plasmaextravasation im Mesenterium untersucht. Daneben wurden die für die Pathogenese wichtigen Mediatoren TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-10 mit in Betracht gezogen.

In der verfassten Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. In welchem Maß werden durch die Therapie mit N-Acetylcystein in Kombination mit Tirilazad Mesylat die mesenteriale Plasmaextravasation und die Leukozytenadhärenz beeinflusst?
2. Inwieweit werden die Plasmaspiegel der Entzündungsmediatoren TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-10 bei Endotoxinämie durch die Gabe der Antioxidantienkombination beeinflusst?
3. Führt die Gabe der Substanzkombination bei Endotoxinämie auch zur Veränderungen der Leukozytenzahl im peripheren Blut?

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Tiere und Tierhaltung**

In dieser Studie wurden 30 männliche Wistar-Ratten im Alter von 6-7 Wochen untersucht. Das Gewicht der Versuchstiere betrug 200-260g. Die Versuchsreihen unterlagen der Richtlinien für die Durchführung von Tierversuchen nach §2, sowie §8 des Tierschutzgesetzes und wurden von der zuständigen Senatsbehörde für Gesundheit des Landes Berlin genehmigt (G 0133/00). Die Versuche wurden von September bis Dezember 2002 durchgeführt. Die Tierhaltung erfolgte in einem klimatisierten Raum (Raumtemperatur 27°C, Luftfeuchtigkeit ca. 60%) in Standardkäfigen auf entstaubter Holzgranulasteinstreu unter 12-stündigem Hell/Dunkel Rhythmus. Die Tiere erhielten Wasser ad libitum und Standardnahrung (Altromin® Pellets, Firma, Lage, Deutschland). Die Tiere wurden eine Woche nach Anlieferung im Versuch eingesetzt. 12 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Tiere nüchtern gesetzt, Wasser wurde weiter ad libitum gewährt.

#### **3.2 Gruppeneinteilungen**

Es erfolgte eine randomisierte Einteilung in 3 Untersuchungsgruppen à 10 Tiere pro Gruppe:

1. Kontrollgruppe

2. Endotoxingruppe: LPS 10 mg/kg Körpergewicht (KG)

3. NAC/TM-Gruppe: LPS 10 mg/kg KG  
NAC 150 mg/kg KG und TM 10 mg/kg KG

#### **3.3 Versuchsablauf**

Der allgemeine Versuchsablauf wurde für alle Gruppen nach einem einheitlichen Versuchsprotokoll durchgeführt. Die gesamte Präparationsdauer betrug ca. 30 Minuten. Sie beinhaltete die Tracheotomie, das Einlegen der intravasalen Katheter in die Vena jugularis interna und Arteria carotis communis sowie die mediane Laparotomie. Danach wurde den Tieren eine Erholungsphase von 15 Minuten gewährt. Anschließend erfolgte die erste Intravitalmikroskopie

mit Videoaufzeichnung. Danach wurde die Endotoxinämie durch Dauerinfusion von LPS über 2 h induziert. Weitere intravitalmikroskopische Untersuchungen folgten nach 60 und 120 Minuten. Die Applikation der Medikamente wurde nach 30 Minuten Endotoxinämie als Bolusinjektion vorgenommen. Die Zeitpunkte der Blutabnahmen sind aus der Abbildung 1 ersichtlich. Nach der letzten Blutabnahme wurde die Tiere mit einer intravenösen Gabe einer Überdosis Chloralhydrat (ca. 25 mg/kg KG) getötet.

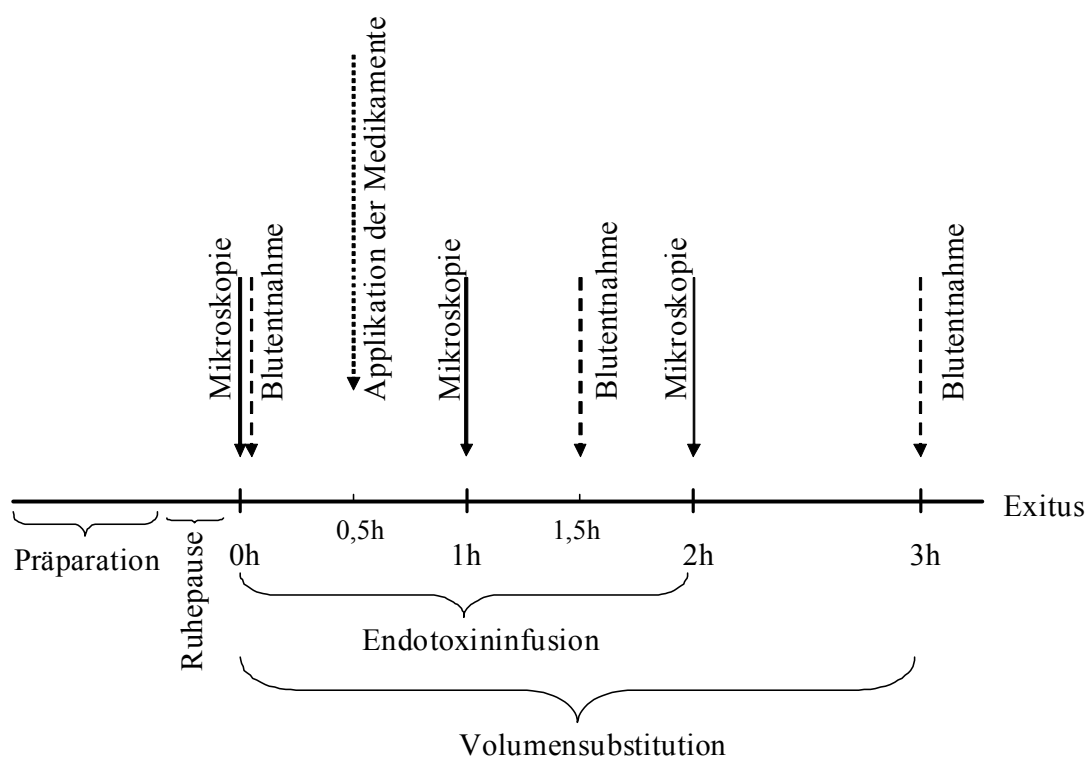


Abbildung 2: Versuchsablauf

### 3.4 Narkoseführung und Monitoring

Die Narkose wurde durch die intraperitoneale Applikation von Pentobarbital in einer Dosis von 60 mg/kg KG eingeleitet (Pentobarbital Natrium, Synopharm GmbH, Barsbüttel, Deutschland). Sie galt in Anlehnung an Ammons et al. und van Lambalgen et al. als adäquat, wenn weder ein Cornealreflex noch Beugereflexe auslösbar waren (4, 192). Überprüft wurde dies durch Betupfen

der Cornea mit einem Wattestäbchen bzw. durch Kneifen in die Pfoten und den Schwanz. Bei Erreichen der gewünschten Narkosetiefe (ca. 10 Minuten nach Pentobarbitalapplikation) wurden die Tiere mittels Klebestreifen in Rückenlage an den Pfoten auf einer Wärmeplatte fixiert. Die Körpertemperatur wurde rektal kontinuierlich gemessen (Thermosonde, W 233, RFT, Strassfurt, Deutschland) und durch die Wärmeplatte bei  $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  aufrechterhalten. Anschließend wurden die Tiere tracheotomiert und die Trachea mit einem Plastikröhrchen intubiert (14G Braunüle, Braun, Melsungen, Deutschland), um Verlegungen der oberen Atemwege auszuschließen. Die Tiere atmeten weiter spontan Raumluft. Sowohl in die rechte Vena jugularis interna als auch in die rechte Arteria carotis communis wurden Polyethylenkatheter (PE 50, ID 0,58 mm, OD 0,96 mm, Portex, Hythe, Kent, GB) eingebracht. Über den arteriellen Katheter erfolgte das kontinuierliche Monitoring des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP) und der Herzfrequenz (HF). Die Atemfrequenz (AF) wurde über den Monitor überwacht (BMT Biomonitor 5231, Druckmesswandler W 112, RFT, Strassfurt, Deutschland). Über den zentralvenösen Zugang erhielten die Tiere eine an den Bedarf adaptierte Narkoseerhaltungsdosis von etwa 20 mg/kg KG/h Pentobarbital.

### **3.5 Operative Techniken**

Alle Tiere jeder Gruppe wurden demselben Prozedere unterworfen. Die gesamte Präparationsdauer beginnend mit der Tracheotomie und endend mit der Katheterisierung dauerte ca. 30-40 Minuten.

Nach Rasur und Desinfektion im Bereich des Halses und des Abdomens wurde die Haut am Hals in der Mittellinie über 2 cm von kranial nach kaudal mit einem Elektro kauter (BCH 50, TUR, Dresden, Deutschland) inzidiert. Danach wurde die proximale Trachea dargestellt, mit einer Mikroschere ein ca. 2-3 mm großer Querschnitt unterhalb des 6.-8. Ringknorpels gesetzt und die Trachea wurde mit einem Kunststofftubus intubiert. Anschließend wurde zuerst die rechte Vena jugularis interna dargestellt. Nach distaler Ligatur und proximaler Abklemmung des Gefäßes mittels Microclip erfolgte die Kathetereinlage in Venae-section-Technik, die Fixierung des Katheters mit Haltefäden und die Entfernung des Mikroclips. Danach wurde analog mit der rechten Arteria carotis communis verfahren. Abschließend wurde die Halswunde mit einer fortlaufenden Naht (Ethibond<sup>®</sup>, 3,5 metric, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen.

Über den zentralvenösen Zugang erfolgten die Aufrechterhaltung der Narkose (mittlere Erhaltungsdosis von 6 mg/h Pentobarbital), sowie eine Volumensubstitution mit Vollelektrolytlösung (Thomaejonin<sup>®</sup>, Thomae, Biberach, Deutschland). Des Weiteren wurden sowohl die Kontrastmittel Fluoresceinisothiocyanat-(FITC) Albumin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und Rhodamin-6G (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), als auch die Pharmaka N-Acetylcystein (Fluimucil Antidot<sup>®</sup>, Zambon GmbH, Kerpen, Deutschland) und Tirilazad Mesylat (Freedox<sup>®</sup>, Pharmacia & Upjohn AG, Dübendorf, Deutschland) über den zentralvenösen Zugang appliziert.

Für das Auslagern des Darmes wurde entlang der Linea alba ca. 1 cm substernal bis maximal zur Symphyse eine Längslaparotomie vorgenommen. Das Tier wurde in Seitenlage umgelagert und in no-touch-Technik ein ca. 4 cm langes Segment des präterminalen Ileums aufgesucht und auf eine spezielle Haltevorrichtung (Stage) ausgelagert. Zum Mikroskopieren diente ein Deckgläschen als transparente und plane Abdeckung (21x26 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland). Nicht untersuchte ausgelagerte Darmabschnitte wurden mit einer befeuchteten Gaze abgedeckt und alle freiliegenden Mesenterium- und Darmabschnitte kontinuierlich mit einer auf 37°C aufgewärmten Thomaejonin<sup>®</sup>-Lösung superfundiert, um eine Exposition gegenüber Raumluft sowie eine Austrocknung zu vermeiden.

### **3.6 Endotoxinmodell**

Die Endotoxinämie wurde mit 10 mg/kg KG LPS (E.coli, Serotyp O55:B5; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) per Dauerinfusion über den zentralnervösen Zugang induziert. Die Dauerinfusion erfolgte über 120 Minuten, beginnend nach der ersten IVM-Untersuchung. Die Kontrollgruppe erhielt dementsprechend eine Volumensubstitution mit Vollelektrolytlösung (Thomaejonin<sup>®</sup>). 30 Minuten nach der ersten IVM erfolgte die Applikation der Medikamente bzw. des Placebos (physiologische Kochsalzlösung) in einem Bolus.

### 3.7 Intravitalmikroskopie

Für die intravitalmikroskopische Untersuchung wurden folgende technische Hilfsmittel verwendet:

Mikroskopie:	Epifluoreszenzmikroskop Axiotech Vario, Carl-Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Lichtquelle:	HBO 50, Osram, Berlin, Deutschland
Okulare:	10x, Zeiss
Objektive:	40x/0,5, Achroplan, Zeiss
Filter:	Filtersatz Nr. 20, Zeiss, (Anregung: BP 546/12; Frequenzteiler: 560;  Emission: BP 575-640) für Beobachtung im Rhodamin-6G-Kontrast;  Filtersatz Nr. 10, Zeiss (Anregung: BP 450-490; Frequenzteiler: 510;  Emission: BP 515-565) für Beobachtung im FITC-Albumin-Kontrast
Videokamera:	Panasonic S-VHS, AG-7355 E, Matsushita Electric Ind. Co. Ltd., Tokio Japan
Videorecorder:	Panasonic S-VHS, AG-7355 E, Matsushita Electric Ind. Co. Ltd., Tokio Japan
Monitor:	TM-122EG, JVC, Tokyo, Japan
Video Timer:	For-A-Company, Tokyo, Japan, finale Monitorvergrößerung 250-500fach



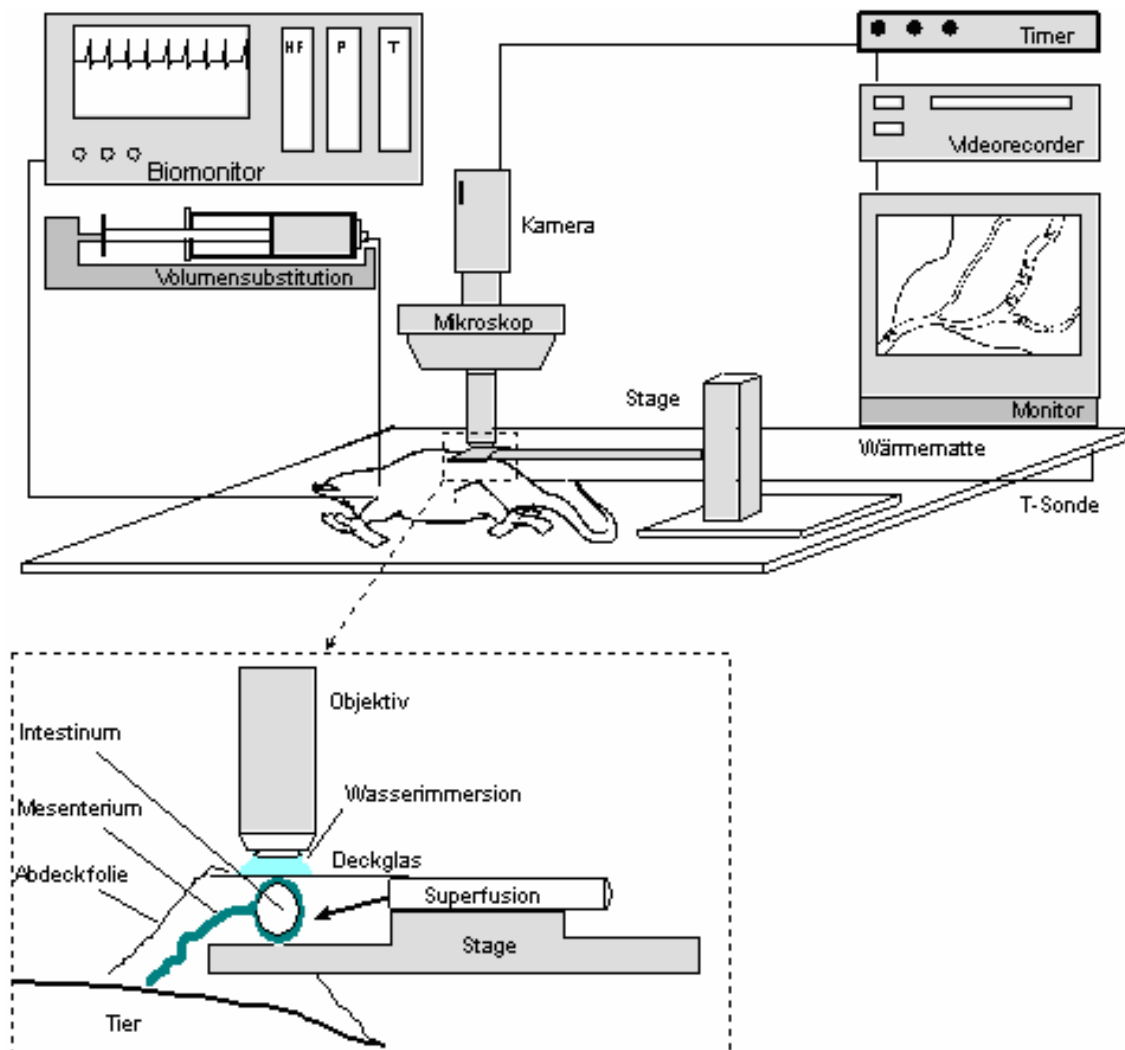


Abbildung 3: Versuchsaufbau

Nach dem Auffinden und der Fokussierung eines geeigneten Gefäßes im Mesenterium, das heißt einer Venole mit einem Durchmesser von 25-40  $\mu\text{m}$ , wurden über den zentralvenösen Zugang einmalig 50 mg/kg KG 2,5% FITC-Albumin appliziert, um durch den resultierenden Helligkeitsunterschied zwischen dem Plasma und dem das Gefäß umgebenden Gewebe die mesenteriale Plasmaextravasation beurteilen zu können. Sofort nach der Gabe des FITC-Albumins wurde ein Bolus von 0,1 ml Rhodamin-6G 0,05% ebenfalls über den zentralvenösen Zugang appliziert (0,1 ml vor der ersten IVM, 0,05 ml vor der zweiten und dritten IVM). Hiermit wurden die Leukozyten optimal markiert. Mit Hilfe des FITC-Filters

wurde nach einer 10 minütigen Ruhe- und Einwirkpause von FITC-Albumin und Rhodamin-6G eine Videoaufzeichnung über 30 Sekunden vorgenommen. Ebenso erfolgte eine Videoaufzeichnung des entsprechenden Gefäßes mit Hilfe des Rhodamin-6G-Filters über 30 Sekunden. Die effektive Mikroskopierzeit betrug für beide Aufnahmen insgesamt ca. 15 Minuten. Es wurden für den Versuch insgesamt drei Videoaufzeichnungen mit beiden Filtern durchgeführt. Zur Überprüfung des kontinuierlichen Blutflusses im beobachteten Gefäß wurde während des gesamten Versuches das Gefäß jede halbe Stunde auf Thrombosierungen untersucht. Die Auswertung aller Videosequenzen erfolgte verblindet „off-line“ am Videomonitor und Computerarbeitsplatz.

### **3.7.1 Extravasation**

Mit Hilfe von FITC-Albumin wurde das Plasma markiert. Dadurch stellte sich unter Blauanregung ein optimaler Helligkeitsunterschied zwischen dem Interstitium (dunkel) und den plasmadurchströmten Venolen (hell) dar und es konnten Rückschlüsse auf die Verschiebung des Plasmas in den Extravasalraum gezogen werden. Die auf videomikroskopisch aufgezeichneten Fluoreszenz-Bilder wurden digitalisiert und mittels computerunterstützter Analyse (CAPIMAGE, Ingenieurbüro Dr. Zeintl GmbH, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet. Dabei wurde der Fluoreszenzintensität in den Venole und in den angrenzenden Gewebe vom Computer Grauwerte von 1 (schwarz, keine Fluoreszenz) bis 255 (weiß, maximale Fluoreszenz) zugeordnet. Es wurden zu jedem Messzeitpunkt 3 Messungen jeweils innerhalb der Venole ( $I_{IV}$ ) und außerhalb im direkt angrenzenden Interstitium ( $I_{ev}$ ) vorgenommen. Die Werte wurden gemittelt und die Plasmaextravasation wurde definiert durch die Ratio  $I_{ev}/I_{IV}$ .

### **3.7.2 Leukozyten-Endothel-Interaktion**

Die Leukozyten wurden mit Rhodamin-6G markiert, und es wurden folgende Stadien der Leukozytenadhäsion ausgewertet:

- a) Anzahl der temporär adhärenenten Leukozyten, das heißt Leukozyten, die in einem vorgegebenen Zeitraum (30 Sekunden) den untersuchten Gefäßabschnitt mit einer typischen Geschwindigkeit von 50  $\mu\text{m/s}$  passierten und somit aufgrund ihrer temporären Interaktion am

Gefäßendothel entlang „rollten“ (Roller). Ermittelt wurde die Anzahl pro Minute, ausgedrückt als Roller-Flow (n/min).

- b) Anzahl der fest adhären Leukozyten (Sticker), die, bezogen auf eine bestimmte Fläche, für mindestens 30 Sekunden am Gefäßendothel hafteten.

Für die Berechnung der Gefäßinnenfläche wurde von einer Zylinderstruktur des Gefäßes ausgegangen:

Zylinderfläche:  $A = l \cdot U$  ( $l$ = Länge des Gefäßes)

Zylinderumfang:  $U = \pi \cdot d$  ( $d$ = Durchmesser des Gefäßes)

Sticker pro Fläche:  $= n/\text{mm}^2$

### **3.8 Laborparameter**

Alle Blutabnahmen erfolgten über den arteriellen Zugang. Für die Verlaufsbeurteilungen wurde Blut für unten aufgeführte Parameter zu folgenden Messzeitpunkten abgenommen:

- vor der Gabe von Rhodamin-6G, FITC-Albumin und LPS (Messzeitpunkt 0)
- 1,5 Stunden nach der ersten Blutentnahme (Messzeitpunkt 1)
- 3 Stunden nach der ersten Blutabnahme (Messzeitpunkt 2)

#### **3.8.1 Leukozytenzahl**

Für die Bestimmung der Anzahl der Leukozyten wurde eine EDTA behandelte Kunststoff-Kapillarpipette (Kabe, Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) mit 50  $\mu\text{l}$  Blut gefüllt und am Zellcounter ausgewertet (Zell-Counter: Technicon H\*1, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland). Die Eichung dieses Gerätes erfolgte gegen Standards von Paratech (Streck Laboratories, Inc., Omaha, USA). Die Messung erfolgte spätestens 12 Stunden nach Gewinnen der Probe und Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4°C.

### **3.8.2 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10**

Für die Bestimmung der Plasmakonzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-10 wurde eine EDTA-Microvette (500KE, Ka-EDTA, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) mit 500  $\mu$ l Blut gefüllt, anschließend bei 6000 Umdrehungen/min 15 Minuten lang zentrifugiert (Tischzentrifuge, Janetzki TH 12, Janetzki, Ilmenau, Deutschland), der Plasmaüberstand (200  $\mu$ l) abpipettiert und 1:1 mit 200  $\mu$ l NaCl verdünnt. Die Proben wurden gleichmäßig auf 6 Eppendorfgefäße zu je 60  $\mu$ l verteilt und bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren. Die Konzentrationsermittlung der oben angegebenen Parameter erfolgte mit Hilfe von standardisierten rattenspezifischen ELISA („Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays“)- Kits (Quantikine Rat, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstedt, Germany). Die Konzentrationswerte wurden auf Grund der Verdünnung (s.o) mit 2 multipliziert.

### **3.9 Statistische Methoden**

Da kleine Fallzahlen, eine unregelmäßige Verteilung und Ausreißer vorlagen, wurden nichtparametrische Maßzahlen und Methoden zur Darstellung und Auswertung benutzt.

Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  angesetzt. Da die p-Werte explorativ betrachtet wurden, war eine  $\alpha$ -Adjustierung nicht notwendig.

Um die Unterschiede zwischen den Gruppen und um Zeiteffekte zu untersuchen, wurde eine 2-faktorielle nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholung nach Brunner durchgeführt (Statistikprogramm SAS 8.2).

Gruppenvergleiche an bestimmten Zeitpunkten wurden mittels des Mann-Whitney-U-Testes, Unterschiede zwischen zwei Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe mit dem Wilcoxon Test untersucht (Statistikpaket SPSS 10.0, SPSS Inc., Chicago, USA).

Die Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe der Statistikpakete SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) und SigmaPlot 5.0 (Systat Software Inc., Point Richmond, USA). Die Plasmaextravasation, die Leukozytenadhärenz und die Mediatoren sind in Form von Boxplots als Median mit der 25. und 75. Perzentile, Minimum und Maximum, Ausreißern (o), sowie Extremwerten (\*) dargestellt. Die Vitalparameter (MAP, HF, AF) sind im Verlauf an sieben Messzeitpunkten als Median mit 25. und 75. Perzentile dargestellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Intravitalmikroskopie

#### 4.1.1 Extravasation

In allen Versuchsgruppen gab es keine signifikante Veränderung der Plasmaextravasation über die Versuchszeit. Es gab auch keinen signifikanten Unterschied der Plasmaextravasation zwischen den Versuchsgruppen. Tendenziell konnte man allerdings einen Anstieg der Plasmaextravasation in allen Versuchsgruppen beobachten.

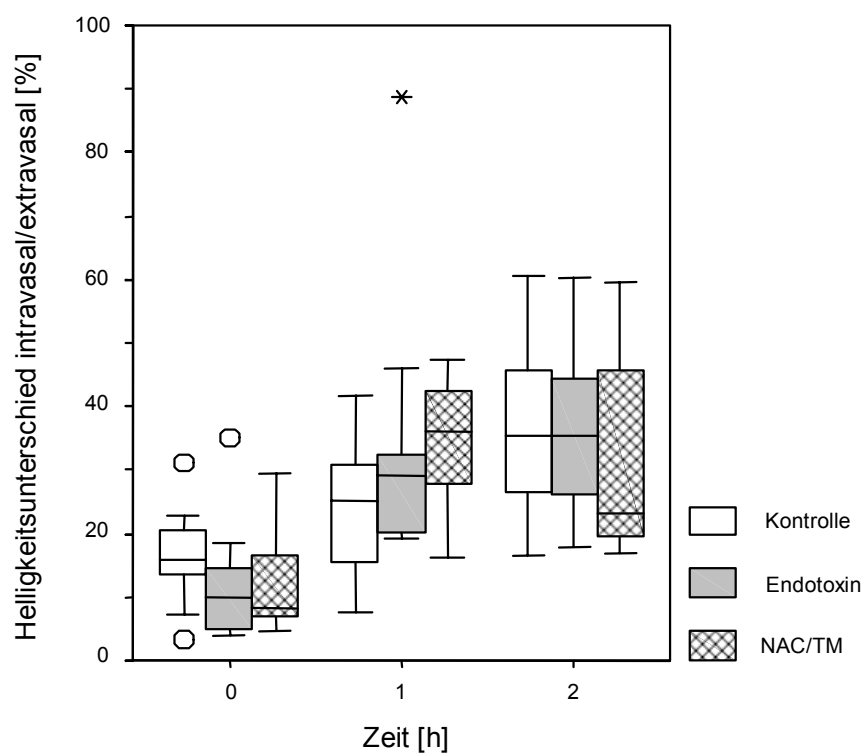


Abbildung 4: Plasmaextravasation

## 4.1.2 Leukozytenadhärenz

### 4.1.2.1 Temporär adhärenente Leukozyten

In allen Gruppen gab es weder eine signifikante Veränderung der Anzahl der temporär adhärenenten Leukozyten über die Versuchszeit, noch lag ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vor. Im Durchschnitt blieb der Rollerflow bei ca. 7 Leukozyten/min in allen Gruppen konstant.

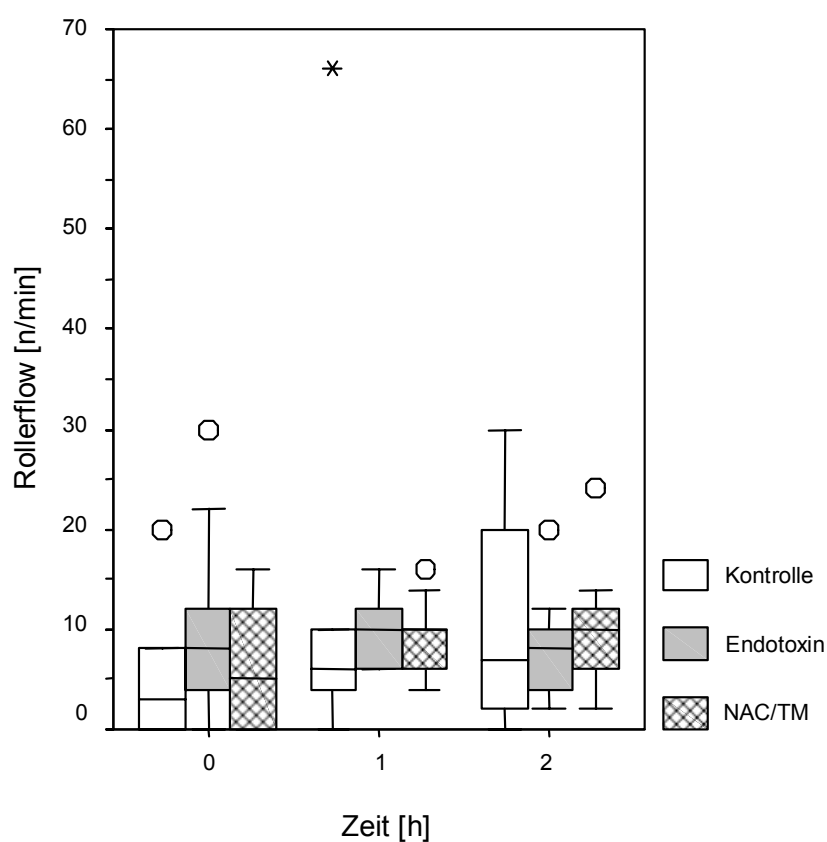


Abbildung 5: Anzahl der temporär adhärenenten Leukozyten (Roller)

#### 4.1.2.2 Fest adhärenente Leukozyten

Die Anzahl fest adhärrierender Leukozyten in der Endotoxingruppe unterschied sich über die Versuchszeit signifikant von der in der Kontroll- ( $p < 0,001$ ) und der NAC/TM-Gruppe ( $p < 0,001$ ). In der Endotoxingruppe war am Messzeitpunkt 1 Stunden eine signifikante Zunahme der Anzahl der fest adhärenenten Leukozyten gegenüber der Kontroll- ( $p < 0,001$ ) und der NAC/TM-Gruppe ( $p = 0,001$ ), sowie gegenüber den Ausgangswerten zu verzeichnen ( $p = 0,009$ ). In der Kontroll- und der NAC/TM-Gruppe unterschieden sich die Anzahl der Sticker über die Versuchszeit nicht signifikant voneinander. In der Kontrollgruppe lag am Messzeitpunkt 1 Stunde eine signifikante Reduktion der Sticker im Vergleich zu den Ausgangswerten vor ( $p = 0,028$ ).

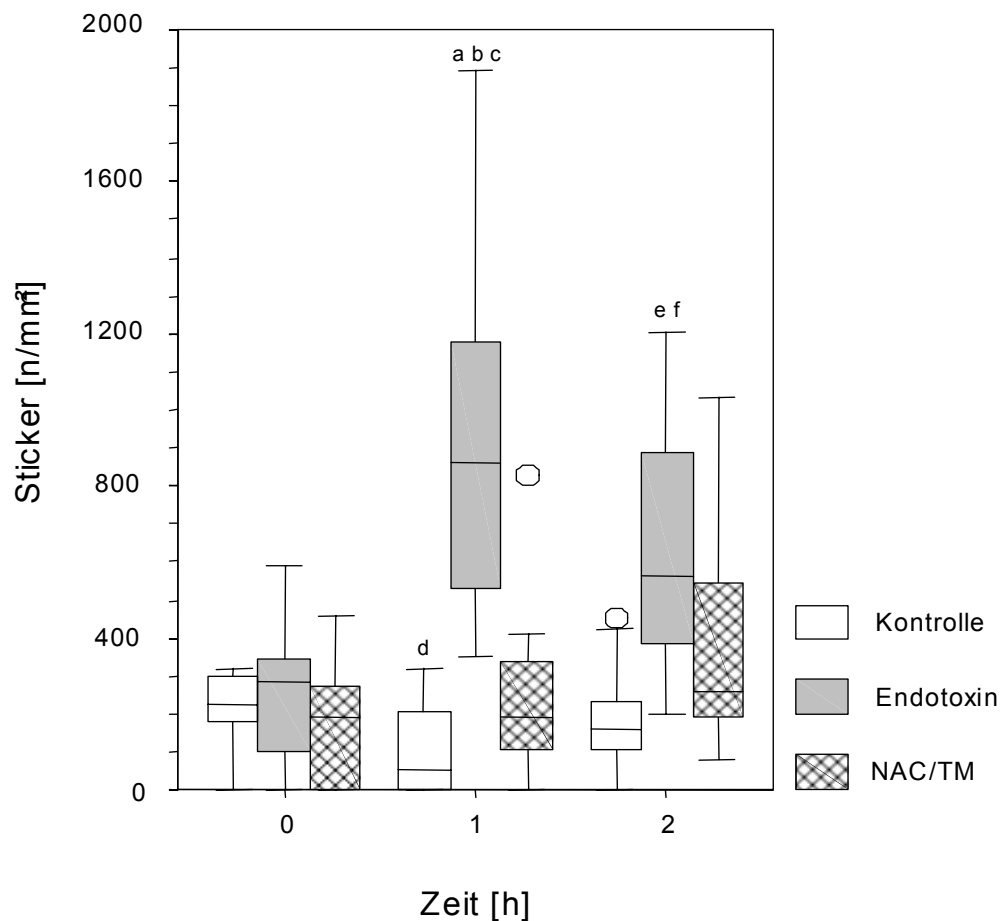


Abbildung 6: Anzahl der fest adhärenente Leukozyten (Sticker)

(Sticker) a  $p < 0,001$  Endotoxin vs. Kontrolle; b  $p = 0,001$  Endotoxin vs. NAC/TM, c  $p = 0,009$  Endotoxin vs. Endotoxin 0h, d  $p = 0,028$  Kontrolle vs. Kontrolle 0h, e  $p = 0,001$  Endotoxin vs. Kontrolle, f  $p = 0,013$  Endotoxin vs. Endotoxin 0h

## 4.2 Laborparameter

### 4.2.1 Leukozytenzahl

In den mit LPS behandelten Gruppen kam es während der Endotoxinämie zu einer signifikanten Reduktion der Leukozyten im peripheren Blut im Vergleich zu der Kontrollgruppe (jeweils  $p < 0,001$ ). Die Endotoxin- und NAC/TM-Gruppe unterschieden sich dabei nicht signifikant voneinander. Am Messzeitpunkt 3 Stunden lag in diesen Gruppen eine signifikante Reduktion der Leukozyten im Vergleich zu ihren jeweiligen Ausgangswerten vor (jeweils  $p = 0,005$ ). In der Kontrollgruppe lag die Leukozytenzahl am Messzeitpunkt 1,5 Stunden mit annähernd dem zweifachen des Ausgangswertes signifikant höher als am Messzeitpunkt 0 Stunden (von ca. 7 auf ca. 13 Gpt/l,  $p = 0,007$ ). Am Messzeitpunkt 3 Stunden lag die Leukozytenzahl in der Kontrollgruppe wieder bei Werten des Ausgangsniveaus.

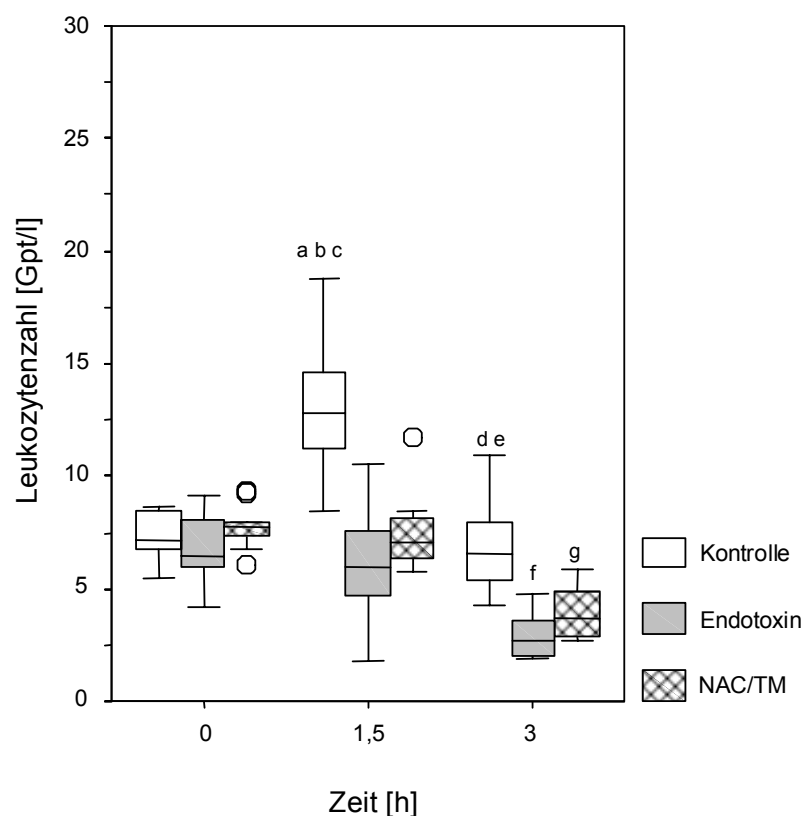


Abbildung 7: Leukozytenzahl

a  $p < 0,001$  Kontrolle vs. Endotoxin, b  $p < 0,001$  Kontrolle vs. NAC/TM, c  $p = 0,007$  Kontrolle vs. Kontrolle 0h, d  $p < 0,001$  Kontrolle vs. Endotoxin, e  $p = 0,001$  Kontrolle vs. NAC/TM, f  $p = 0,005$  Endotoxin vs. Endotoxin 0h, g  $p = 0,005$  NAC/TM vs. NAC/TM 0h



#### 4.2.2 TNF- $\alpha$

In den mit LPS behandelten Gruppen kam es während der Endotoxinämie zu signifikant höheren TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im Vergleich zu der Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ) und im Vergleich zu den Ausgangswerten ( $p$  jeweils  $p = 0,005$ ). Die Endotoxin- und NAC/TM-Gruppe unterschieden sich dabei nicht signifikant voneinander. Am Messzeitpunkt 3 Stunden lagen die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den mit LPS behandelten Gruppen signifikant niedriger als am Messzeitpunkt 2 Stunden (jeweils  $p = 0,005$ ), jedoch noch signifikant höher als ihre jeweiligen Ausgangswerte ( $p$  jeweils  $p = 0,005$ ). In der Kontrollgruppe lagen am Messzeitpunkt 1,5 Stunden signifikant höhere TNF- $\alpha$ -Konzentrationen als am Messzeitpunkt 0 Stunden vor ( $p = 0,005$ ), allerdings lagen sie signifikant unter den Konzentrationen der mit LPS behandelten Gruppen ( $p$  jeweils  $< 0,001$ ).

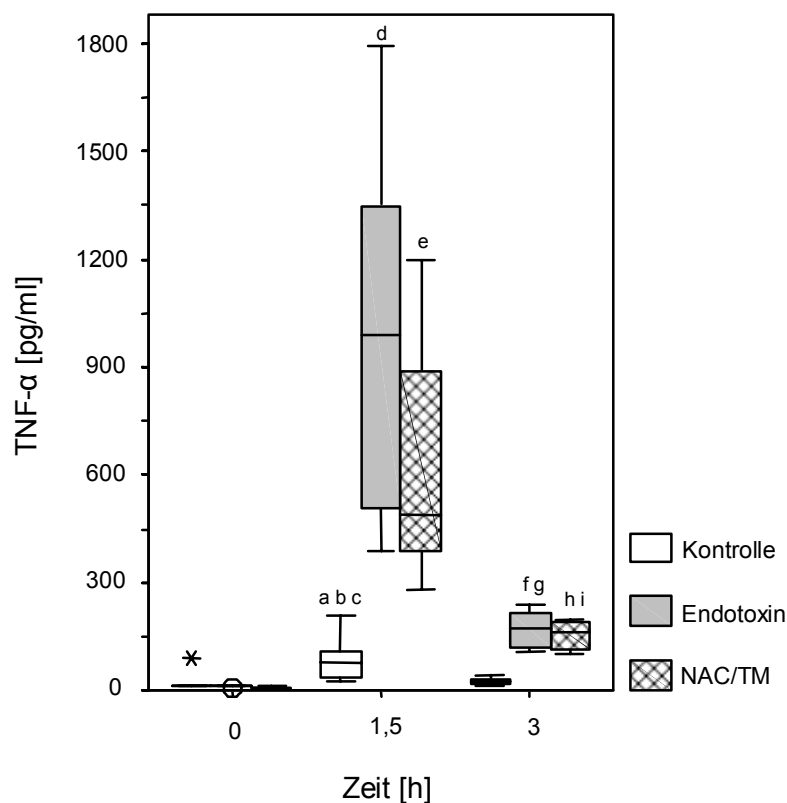


Abbildung 8: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen

a  $p < 0,001$  Kontrolle vs. Endotoxin, b  $p < 0,001$  Kontrolle vs. NAC/TM, c  $p = 0,005$  Kontrolle vs. Kontrolle 0h, d  $p = 0,005$  Endotoxin vs. Endotoxin 0h, e  $p = 0,005$  NAC/TM vs. NAC/TM 0h, f  $p < 0,001$  Endotoxin vs. Kontrolle, g  $p = 0,005$  Endotoxin vs. Endotoxin 0h, h  $p < 0,001$  NAC/TM vs. Kontrolle, i  $p = 0,005$  NAC/TM vs. NAC/TM 0h

### 4.2.3 Interleukin-1 $\beta$

In den mit LPS behandelten Gruppen kam es über die Versuchszeit zu signifikanten Anstiegen der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Vergleich zu der Kontrollgruppe (jeweils  $p < 0,001$ ). Auch gegenüber den Ausgangswerten kam es in diesen Gruppen zu signifikanten Anstiegen der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen (jeweils  $p = 0,005$ ). Am Messzeitpunkt 3 Stunden lagen in den mit LPS behandelten Gruppen ca. 10fach höhere IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Vergleich zu den Ausgangswerten vor (jeweils  $p = 0,005$ ). In der Kontrollgruppe kam es über die Versuchszeit zu keinen signifikanten Änderungen der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen.

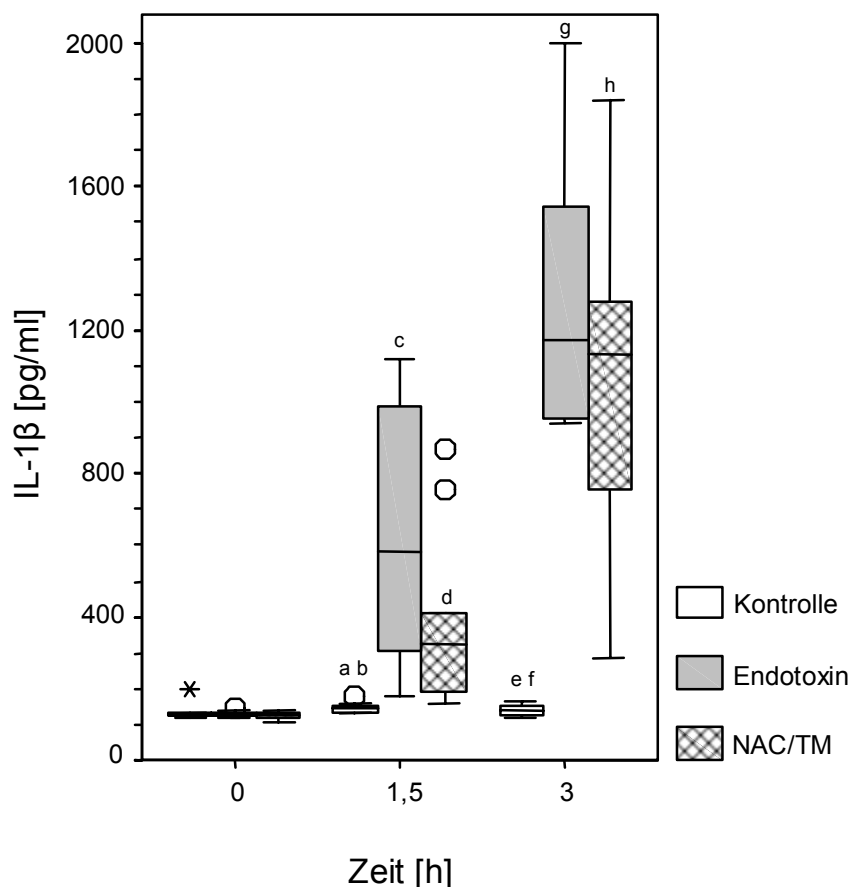


Abbildung 9: Interleukin-1 $\beta$ -Konzentrationen

a  $p < 0,001$  Kontrolle vs. Endotoxin, b  $p < 0,001$  Kontrolle vs. NAC/TM, c  $p = 0,005$  Endotoxin vs. Endotoxin 0h, d  $p = 0,005$  NAC/TM vs. NAC/TM 0h, e  $p < 0,001$  Kontrolle vs. Endotoxin, f  $p < 0,005$  Kontrolle vs. NAC/TM, g  $p = 0,005$  Endotoxin vs. Endotoxin 0h, h  $p = 0,005$  NAC/TM vs. NAC/TM 0h

#### 4.2.4 Interleukin-6

In den mit LPS behandelten Gruppen stiegen die IL-6-Konzentrationen über die Versuchszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant an (jeweils  $p < 0,001$ ). Im Vergleich zu den Ausgangswerten lagen in diesen Gruppen am Messzeitpunkt 2 Stunden signifikante Erhöhungen der IL-6-Konzentrationen um ca. das 100fache vor (jeweils  $p = 0,005$ ). Die IL-6-Konzentrationen lagen in der Endotoxingruppe am Messzeitpunkt 3 Stunden signifikant unter der NAC/TM-Gruppe ( $p < 0,001$ ). In der Kontrollgruppe lagen die IL-6-Konzentrationen an den Messzeitpunkten 2 und 3 Stunden signifikant bei ca. 3-4fach erhöhten Werten im Vergleich zu den Ausgangswerten ( $p = 0,005$ ).

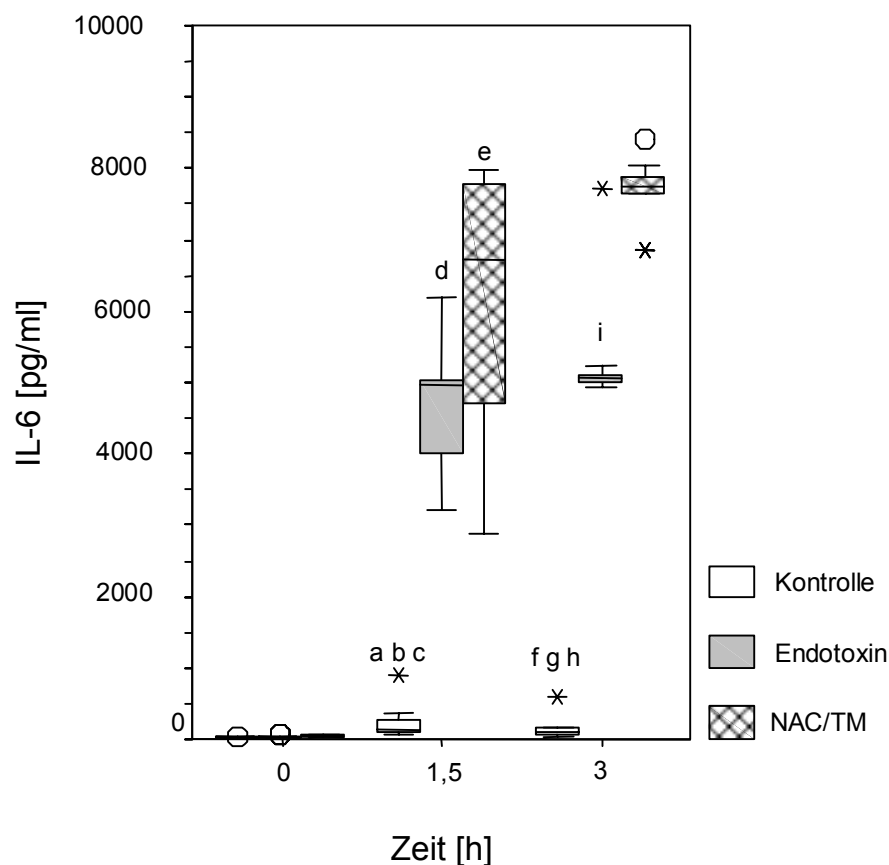


Abbildung 10: Interleukin-6-Konzentrationen

a  $p < 0,001$  Kontrolle vs. Endotoxin, b  $p < 0,001$  Kontrolle vs. NAC/TM, c  $p = 0,005$  Kontrolle vs. Kontrolle 0h, d  $p = 0,005$  Endotoxin vs. Endotoxin 0h, e  $p = 0,005$  NAC/TM vs. NAC/TM 0h, f  $p < 0,001$  Kontrolle vs. Endotoxin, g  $p < 0,001$  Kontrolle vs. NAC/TM, h  $p = 0,005$  Kontrolle vs. Kontrolle 0h, i  $p = 0,001$  Endotoxin vs. NAC/TM

#### 4.2.5 Interleukin-10

Die IL-10-Konzentrationen stiegen über die Versuchszeit in der Endotoxin- und NAC/TM-Gruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe an (jeweils  $p < 0,001$ ). Auch im Vergleich zu den Ausgangswerten lagen in diesen Gruppen signifikante Erhöhungen der IL-10-Konzentrationen vor (jeweils  $p = 0,005$ ). Dabei unterschieden sich die beiden Gruppen nicht signifikant voneinander. In der Kontrollgruppe waren im Vergleich zu den LPS-behandelten Gruppen geringere, aber signifikante Anstiege der IL-10-Konzentrationen am Messzeitpunkt 1,5 Stunden im Vergleich zu den Ausgangswerten zu beobachten ( $p = 0,005$ ). Am Messzeitpunkt 3 Stunden lagen die IL-10-Konzentrationen in allen Gruppen signifikant höher als ihre jeweiligen Ausgangswerte (jeweils  $p = 0,005$ ).

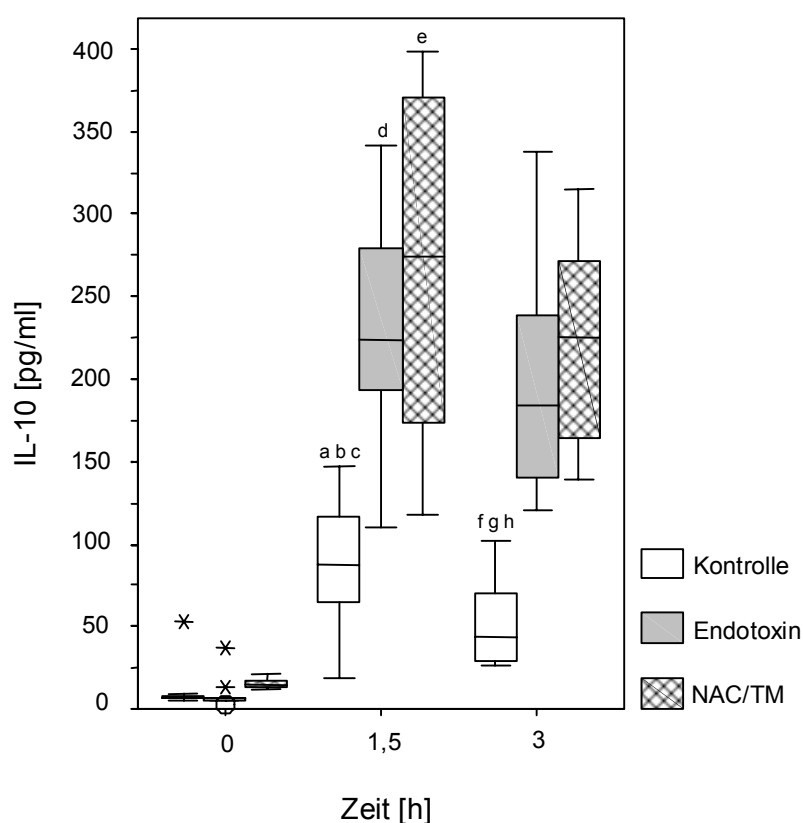


Abbildung 11: Interleukin-10-Konzentrationen

a  $p = 0,001$  Kontrolle vs. Endotoxin, b  $p < 0,001$  Kontrolle vs. NAC/TM, c  $p = 0,005$  Kontrolle vs. Kontrolle 0h, d  $p = 0,005$  Endotoxin vs. Endotoxin 0h, e  $p = 0,005$  NAC/TM vs. NAC/TM 0h, f  $p < 0,001$  Kontrolle vs. Endotoxin, g  $p < 0,005$  Kontrolle vs. NAC/TM, h  $p = 0,005$  Kontrolle vs. Kontrolle 0h

### 4.3 Hämodynamik

#### 4.3.1 Mittlerer arterieller Blutdruck

Bei allen Tieren mit Endotoxinbelastung war am Messzeitpunkt 30 Minuten ein tendenzieller Blutdruckabfall zu beobachten. Es bestand allerdings weder eine Signifikanz im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangswerten noch im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der MAP sank im Durchschnitt nicht unter 90 mmHg.

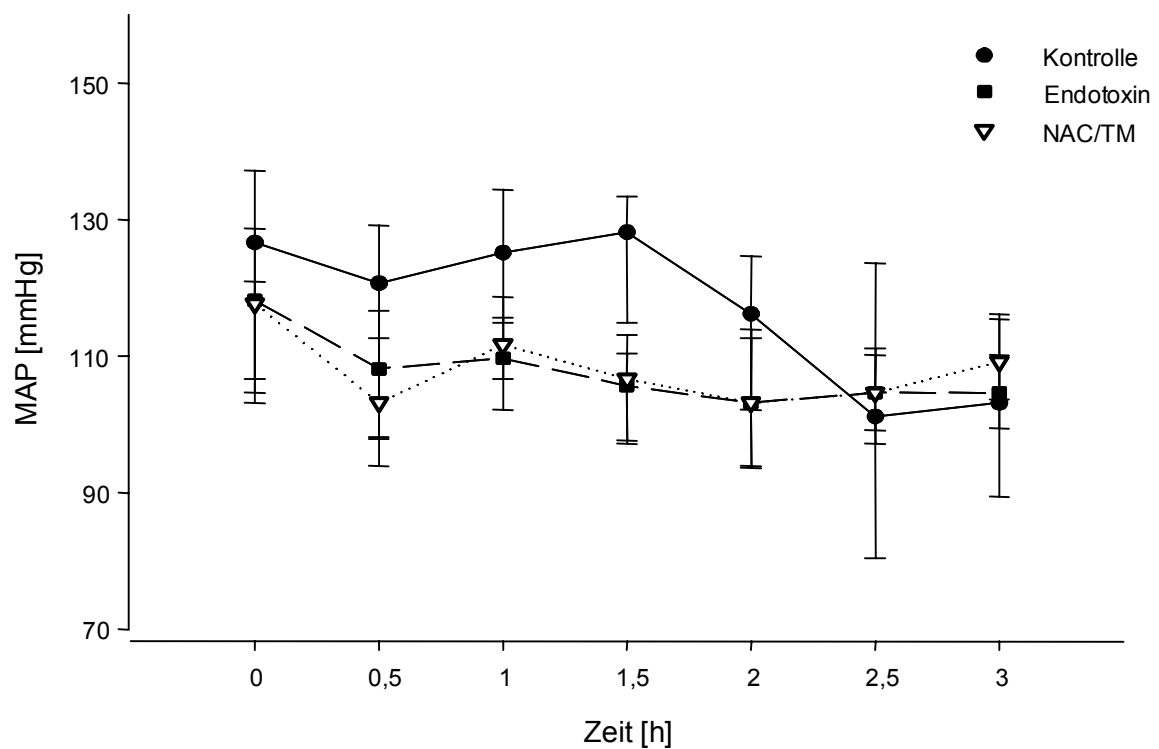


Abbildung 12: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

### 4.3.2 Herzfrequenz

Am Ende des Versuches lagen die Herzfrequenzen der mit Endotoxin behandelten Gruppen bei ca. 390/min im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 330/min signifikant höher ( $p=0,003$  bzw.  $p=0,004$ ). Auch im Vergleich zu den Ausgangswerten lag eine signifikante Erhöhung vor. In der Kontrollgruppe kam es ab dem Messzeitpunkt 1,5 Stunden zu einem tendenziellen Herzfrequenzabfall.

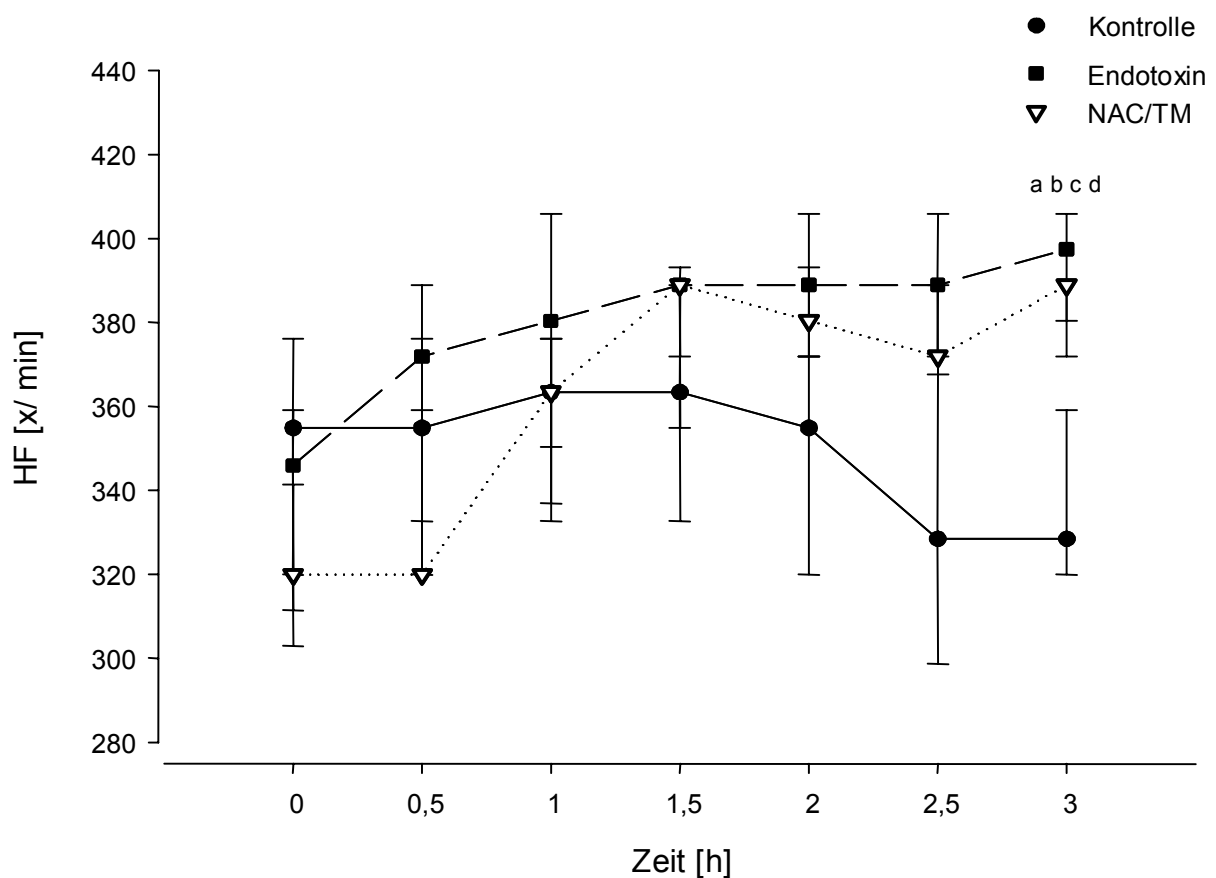


Abbildung 13: Herzfrequenz (HF)

a  $p=0,003$  Kontrolle vs. Endotoxin, b  $p=0,004$  Kontrolle vs. NAC/TM, c  $p=0,005$  Endotoxin vs. Endotoxin 0h, d  $p=0,008$  NAC/TM vs. NAC/TM 0h

### 4.3.3 Atemfrequenz

In den Atemfrequenzverläufen der 3 Gruppen ließen sich keine signifikanten Veränderungen über die Versuchszeit nachweisen. Bereits in den Ausgangswerten lagen große Differenzen in den Medianen der 3 Gruppen vor.

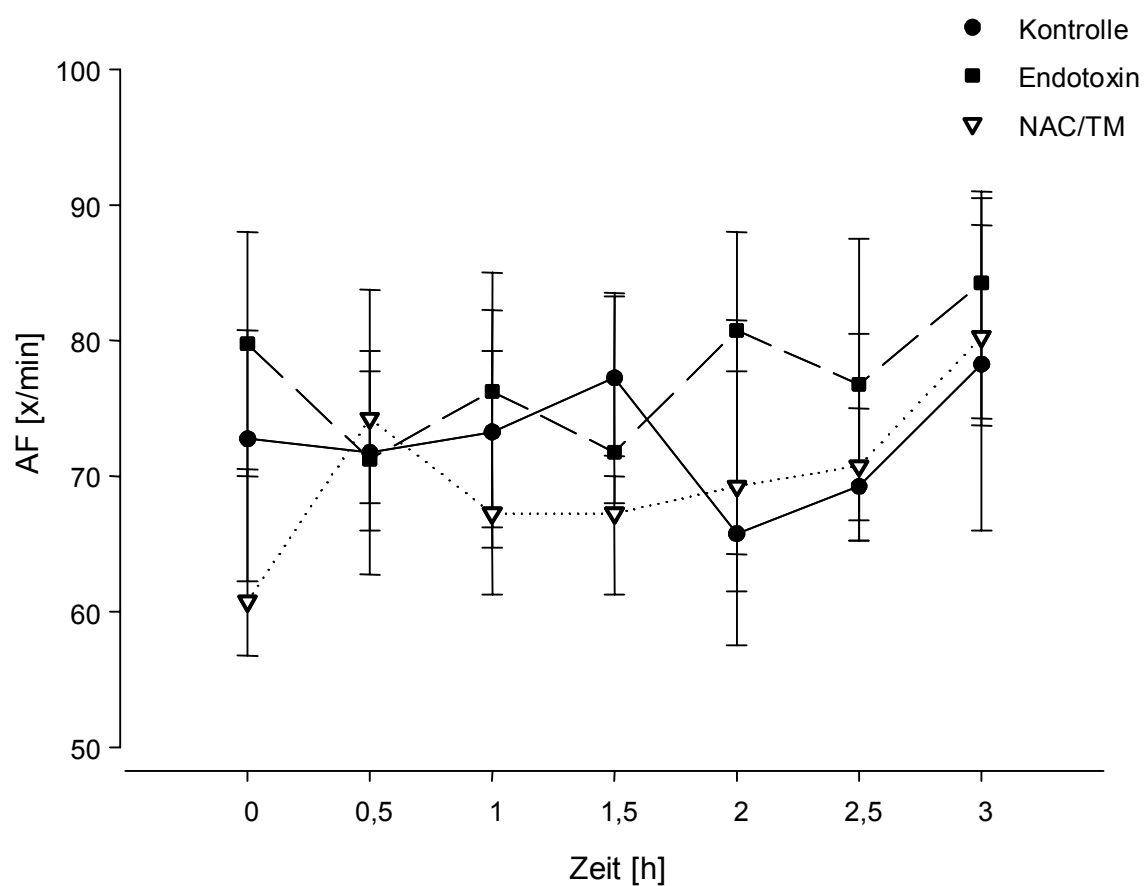


Abbildung 14: Atemfrequenz (AF)

## **5 Diskussion**

### **5.1 Diskussionsgrundlagen**

Die Störung der Mikrozirkulation nimmt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Sepsis ein (48). Dabei kommt es zu einer gesteigerten Adhärenz und Migration von Leukozyten mit konsekutiv erhöhter Plasmaextravasation. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob sich diese Pathomechanismen durch Einsatz einer Kombination der Antioxidantien N-Acetylcystein und Tirilazad Mesylat beeinflussen lassen. Experimentelle Grundlage war das frühe normotensive Sepsismodell, das heißt eine kontinuierliche Infusion von Endotoxin der Versuchstiere.

### **5.2 Methodik**

#### **5.2.1 Sepsismodelle**

Der Tierversuch ist ein unverzichtbares Bindeglied zwischen molekular- bzw. zellbiologischen Untersuchungen und klinischen Studien. Tierexperimente ermöglichen es, unter reproduzierbaren Verhältnissen kausale Untersuchungen am Gesamtorganismus durchzuführen. Dadurch können Pathomechanismen besser aufgeklärt und eventuell effektive Therapieformen entwickelt werden.

Die Schwierigkeit, ein geeignetes tierexperimentelles Sepsismodell zu entwickeln liegt darin, dass sich das klinische Bild, welches simuliert werden soll, als sehr komplex und mannigfaltig darstellt. Die Problematik bei der Definition der Krankheitsentität hat zwangsläufig auch Auswirkungen auf die Validität von Tiermodellen. Dazu kommen die allgemeinen Limitationen von Tierversuchen. Hierzu gehören neben speziesspezifischen Differenzen in anatomischen und metabolischen Merkmalen unterschiedliche Reaktionen auf exogene Noxen. Damit wird eine Übertragung der Tierversuchsergebnisse auf den Menschen oftmals kompliziert (42, 197).

In der Literatur werden im Wesentlichen 4 Tiermodelle benutzt, um pathophysiologisch der Sepsis ähnliche Veränderungen zu induzieren. Dies sind die Implantation von Fäkalien bzw. lebenden Organismen in den Peritonealraum, die Erzeugung von Abszessen, das Cecal Ligation and Puncture-Modell (CLP-Modell) und die intravenöse Applikation von lebenden Organismen oder Endotoxin (197).



Durch die Implantation von Fäkalien oder lebenden Organismen in den Peritonealraum kann eine sehr häufige Sepsisursache, eine Peritonitis, induziert werden. Dieses Modell zeichnet sich durch einen verzögerten Krankheitsverlauf aus. Es beginnt oft, wie beim Menschen, mit einer hyperdynamen Phase (3, 42).

Eine weitere Möglichkeit ein septisches Erkrankungsbild hervorzurufen, ist die Erzeugung eines Hautabszesses durch die Implantation von lebenden Organismen (z.B. *Pseudomonas aeruginosa*) in das Weichteilgewebe. Dieses Modell ist gut geeignet, die hyperdynamen Sepsisabläufe zu untersuchen (197).

Bei dem CLP-Modell wird das Zökum unterhalb der Ileozökalklappe ligiert und mit einer Nadel punktiert. Die aus dem künstlich erschaffenen Leck austretenden Darmkeime erzeugen eine Peritonitis. Die Entstehung der Sepsis-Symptomatik benötigt einen längeren Zeitraum und ähnelt so stark dem klinischen Verlauf (197).

Eine Vielzahl von Sepsismodellen beinhaltet die Applikation von LPS (57, 67, 177). Die Versuchsanordnung wird korrekterweise als Endotoxinämie bezeichnet. Alternativ können auch andere Toxine verabreicht werden. Die intraperitoneale Gabe von LPS unterscheidet sich klinisch nicht wesentlich von den oben beschriebenen intraperitonealen Infektionsmodellen. Je nach Dosis und Dauer der Applikation können akute oder chronische sepsisähnliche Zustände induziert werden. In vielen klinischen Studien konnte die Bedeutung der Endotoxinämie in der Pathophysiologie der Sepsis bestätigt werden. In einer Studie von Danner et al. wurde an 110 kritisch kranken Patienten der Gehalt an LPS im Blut untersucht. Eine Patientengruppe (Gruppe 1) hatte eine bewiesene oder vermutete Sepsis, die andere (Gruppe 2) einen Schock nicht septischer Genese. In den Blutproben von 43% der Patienten der Gruppe 1 und nur von 10% der Gruppe 2 wurde LPS gefunden (52). Weitere Hinweise für die pathophysiologische Bedeutung von LPS stammen aus Studien freiwilliger Probanden. Ihnen wurde 4 ng/kg KG LPS verabreicht. Sie entwickelten hämodynamische, hämatologische und metabolische Veränderungen, die in qualitativer Hinsicht auch bei septischen Patienten zu finden sind, wie z.B. Tachykardie, Blutdruckabfall, Fieber, Leukozytose, Lymphozytopenie und erhöhtes Herzzeitvolumen (161).

Als Quintessenz kann man feststellen, dass LPS eine Vielzahl von Pathomechanismen in Gang setzen kann, die letztendlich klinische Symptome, biochemische Veränderungen und Organdysfunktionen auslösen, die auch bei Sepsis zu beobachten sind (43, 155).

Das CLP-Modell wird von vielen Autoren, die sich mit experimentellen Sepsismodellen befassen, bevorzugt (68, 197). Der Vorteil dieses Modells liegt darin, dass die Entstehung der Sepsis-Symptomatik einen längeren Zeitraum benötigt und somit am ehesten das klinische Bild der Sepsis repräsentieren kann. Dadurch ergibt sich aber nachteilig eine längere Versuchszeit.

Die Ergebnisse sind nicht gut reproduzierbar, da die Quantität und die Art der freigesetzten, sepsisauslösenden Keime relativ schlecht definierbar sind (68).

Beim Endotoxinmodell wird die Art des Toxins vom Untersucher festgelegt. Die exakte Festlegung der Sepsis auslösenden Endotoxindosis und der exakt reproduzierbare Symptom-Zeitverlauf sind von Vorteil. Dosisabhängige laborchemische Veränderungen können, neben pathophysiologischen und klinischen Symptomen, bereits 30-45 Minuten nach Applikation des LPS beobachtet werden (198). Aufgrund dieser Vorzüge wird dieses Modell häufig in der Literatur verwendet (114, 173). Als Nachteil des Endotoxinmodells gilt die Tatsache, dass im Gegensatz zum CLP-Modell kein vollwertiges Bakterium als Agens dient. Daneben sind Sensitivitätsunterschiede verschiedener Tierspezies gegenüber Endotoxin und verschiedene Versuchsdesigns zu beachten (58, 67, 177, 203). In unserer Studie ließen uns die oben genannten Vorteile das Endotoxinmodell wählen.

Zu beachten ist, dass zwischen einzelnen Chargen desselben Serotyps von LPS Wirkungsunterschiede auftreten können (54). Daher verwendeten wir in unserer Studie ausschließlich das LPS von E.coli O111:B4. Dabei handelt es sich um einen häufig in der Literatur eingesetzten Serotyp (1, 40, 73, 89, 136, 166). Von wesentlicher Bedeutung ist, ob die Applikation im Bolus oder kontinuierlich erfolgte (197). Fink et al. beschrieben ein Kaninchenmodell mit intraperitonealer Bolusgabe von LPS im Bolus. Je nach Höhe der Dosis konnte das Bild eines hypo- bzw. hyperdynamen Stadiums der Sepsis beobachtet werden. Dabei induzierten niedrige Dosierungen (1,3 µg/kg KG) ein hyperdynames, hohe Dosierungen (5 mg/kg KG) dagegen eher ein hypodynames Bild (68).

Die intravenöse Dauerinfusion von Endotoxin eignet sich am besten, kurzfristig verschiedene Sepsis-Phasen zu induzieren. Daher wählten auch wir diese Applikationsform. In geringer Dosierung kontinuierlich verabreicht ruft Endotoxin bei Ratten ein hyperdynamisches Sepsisbild hervor (41). Höhere Dosierungen (40 mg/kg KG) lösen ein hypodynamisches Bild mit erhöhten peripheren Widerständen und erniedrigten Herzzeitvolumina aus (103). Xu et al. beschrieben ein Endotoxinmodell, welches unserer Versuchsanordnung sehr ähnlich ist. Sie behandelten Ratten mit 5 mg/kg KG Endotoxin von E.coli O55:B5 und konnten einen Anstieg der Herzfrequenz bei unveränderten MAP beobachten. Das erhöhte Herzminutenvolumen eine Stunde nach Induktion der Endotoxinämie ließ sie auf ein hyperdynamisches Modell der Endotoxinämie schließen. Auf Grund der Vergleichbarkeit unserer Versuchsanordnung mit der von Xu et al. kann auch bei unserem Modell von einem hyperdynamischen Kreislaufverhalten ausgegangen werden (198).

Daneben sind Leukozytopenie und Tachykardie Merkmale, die per definitionem zur Diagnose des SIRS herangezogen werden (34).

Der Darm nimmt eine Schlüsselrolle während der Sepsis ein (82). Der Verlust der Darmbarriere und die dadurch mögliche systemische Expansion von Bakterien, bzw. ihrer Toxine ist als „bakterielle Translokation“ definiert (19). Das Konzept der bakteriellen Translokation konnte in mehreren Studien bestätigt werden. Experimentell wurde dies unter anderem in trauma-assoziierten Tiermodellen, wie dem hämorrhagischen Schock (13), der Verbrennungsverletzung (127, 128), nach Gabe von Endotoxin (143) oder dem Weichteiltrauma (56) nachgewiesen. Translozierte Bakterien bzw. ihre Produkte können in der Darmwand durch phagozytierende Zellen festgehalten werden und zu einer Aktivierung des GALT führen. Neben der Freisetzung von Zytokinen aus immunkompetenten Zellen im Bereich des Darmes findet eine lokale Aktivierung des humoralen Kaskadensystems bzw. phagozytärer Zellsysteme statt (82). Durch dieses positive Feedback, zusammen mit der primären Aktivierung des Immunsystems und dem gegebenenfalls beeinträchtigten Regulationsmechanismus schwerverletzter Patienten, kann es zu einer so genannten „Mediatorexplosion“ im Rahmen einer überschießenden inflammatorischen Reaktion kommen (55). Im Vordergrund unserer Untersuchung standen die Veränderungen der mesenterialen Mikrozirkulation, vor allem der endotoxininduzierten vermehrten Leukozyten-Endothel-Interaktion und Extravasation.

Von erheblicher Bedeutung für die Untersuchung septischer Veränderungen im Tiermodell ist auch die Wahl des Narkoseverfahrens. Fentanyl und Ketamin beeinflussen laut Studien die Leukozyten-Endothel-Interaktion, im Gegensatz zu Pentobarbital (100, 170). Etabliert hat sich das Pentobarbital zur Narkoseführung bei Untersuchungen der Mikrozirkulation im Tiermodell (136, 147), welches auch in unserer Versuchsanordnung gewählt wurde.

Der Einfluss der Markersubstanzen, wie Rhodamin-6G und der Fluoreszenzmikroskopie wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Bei langen Bestrahlungen mit fluoreszierendem Licht und bei Langzeitinkubation mit Rhodamin kann es ebenfalls zur Beeinflussung der Leukozyten-Endothel-Interaktion kommen. Zur von uns angewendeten Methodik (Fluoreszenzmikroskopie mit Rhodamin-6G) werden in der Literatur keine signifikante Veränderung der Leukozyten-Endothel-Interaktion angegeben (118, 148, 200).

### **5.3 Intravitalmikroskopie**

Die Intravitalmikroskopie bietet eine sehr gute Möglichkeit für die Beobachtung der mikrohämodynamischen Situation in vivo (196). Statische Laborparameter oder histologische Schnitte können nur Momentaufnahmen der Mikrozirkulation wiedergeben. Die IVM macht eine Beurteilung der dynamischen Verhältnisse, wie der Leukozyten-Endothel-Interaktion und der Extravasation möglich.

#### **5.3.1 Extravasation**

Die Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität („capillary-leak-Syndrom“) ist ein Kennzeichen der frühen Gewebeschädigung in der Sepsis. Sie wird durch inflammatorische Stimuli mediatorabhängig mehr oder weniger schnell und stark ausgelöst. Aus der erhöhten Wandpermeabilität des Endotheles resultieren eine Extravasation von Plasma und ein erhöhter Lymphabfluss in das Interstitium. Wenn die Transportkapazität der Lymphgefäße überschritten wird, kommt es zu einem Rückstau und konsekutiv zu einem Ödem. Dieses stellt einen frühen Indikator der Organdysfunktion dar und geht dem Organversagen voraus. Obwohl während Endotoxinämie die Extravasation in allen Geweben auftreten kann, wird der Gastrointestinaltrakt, hier vor allem der Dünndarm, als Hauptort dieses Prozesses angesehen

(193). Das Ausmaß der Extravasation hängt dabei von der Gefäßoberfläche, der Wandpermeabilität und dem intravasalen Druck ab. Das Stromgebiet der postkapillären Venolen ist die Lokalisation mit der am stärksten ausgeprägten Permeabilität (181, 199).

Inwieweit eine gesteigerte Adhärenz der Leukozyten im Rahmen der Endotoxinämie einen Anstieg der Extravasation zu Folge haben kann, wird in der Literatur unterschiedlich beurteilt. Zum einen wurde berichtet, dass die Zunahme der Plasmaextravasation, wie sie z.B. nach Leukotrien-B4- oder LPS-Stimulation zu beobachten war, durch experimentelle Neutropenie vermieden werden konnte (199). Afors et al. beschrieben, dass monoklonale Antikörper gegen CD18 die Leukozytenadhärenz und damit die Extravasation reduzieren konnten (88). Zum anderen berichteten Kubes et al., dass unter dem Einfluss von LTB<sub>4</sub> (Leukotrien B<sub>4</sub>) und PAF ein Anstieg der Leukozytenadhärenz stattfand, aber nur unter PAF auch eine Erhöhung der Extravasation nachweisbar war (113). Man vermutet, dass für die Erhöhung der Plasmaextravasation postkapillärer Venolen während Endotoxinämie sowohl leukozytenabhängige Mechanismen existieren, als auch Mediatoren, die direkt am Endothel eine erhöhte Permeabilität verursachen. Diese Annahme wird auch durch unsere Ergebnisse unterstützt, da der Einsatz von NAC und TM eine Leukozytenadhärenz wirksam verringern konnte, es aber dennoch zu einer tendenziell erhöhten Endotoxin-induzierten Extravasation kam.

Im Rahmen unserer Studie konnte das Ausmaß der Extravasation durch Zunahme der Fluoreszenzaktivität im Interstitium untersucht werden. In allen Versuchsgruppen kam es zu einer tendenziellen Erhöhung der Extravasation, also auch bei der Kontrollgruppe. Signifikante Erhöhungen lagen allerdings in keiner der Gruppen vor.

In der Literatur wurde von einigen Arbeitsgruppen an Ratten ein Anstieg der Extravasation durch intravenös oder topisch appliziertes Endotoxin beschrieben (181, 193, 199). Dies war bei uns nur tendenziell der Fall, allerdings ebenfalls in der NAC/TM- und der Kontrollgruppe. Schmidt et al. beschrieben in intravitalmikroskopischen Studien an Ratten, deren Methodik der unsrigen glichen, dass 150 mg/kg KG NAC die endotoxininduzierte Extravasation mesenterialer Venolen abschwächen kann (172, 176). Eine weitere Untersuchung an endotoxämischen Ratten von Schmidt et al. beschrieb, dass die Gabe von 10 mg/kg KG TM keinen Einfluss auf die endotoxininduzierte Plasmaextravasation hat (171). Allerdings erhielten die Tiere zur Induktion der Endotoxinämie nur 2 mg/kg/h KG LPS (172, 176).

In unserer Versuchsanordnung erhielten die Tiere die 5fache Endotoxindosis, was eventuell die abweichenden Ergebnisse erklären könnte. Um unsere tendenziellen Ergebnisse zu bestätigen, dass NAC in Kombination mit TM die Extravasation verringern kann, müssten weitere Untersuchungen, gegebenenfalls mit einer geringeren Endotoxindosis, folgen.

Beide von uns eingesetzte Substanzen sind Antioxidantien und wirken einer Gewebsschädigung durch Sauerstoffradikale entgegen. TM hemmt die Lipidoxidation und wirkt somit direkt membranstabilisierend am Endothel (46). Dadurch kann die Plasmaextravasation vermindert werden. NAC ist ein so genannter Radikalfänger, hebt den endogenen Antioxidantienstatus, verringert somit oxidative Gewebeerstörung und hemmt zusätzlich oxidierende Enzyme. Dadurch kann das Endothel ebenfalls vor Membranschädigung geschützt werden (172). Diese Eigenschaften könnten den Einsatz der beiden Substanzen zu einer sinnvollen Therapie der erhöhten Plasmaextravasation bei Sepsis machen.

### **5.3.2 Leukozytenadhärenz**

Der Begriff der Leukozyten-Endothel-Interaktion fasst eine Sequenz von Vorgängen zusammen. Beginnend mit der Margination der Leukozyten aus der Blutstrommitte über das temporäre Interagieren der Leukozyten mit dem Endothel (Rolling) und die anschließende feste Adhärenz der Leukozyten am Endothel (Sticking) führen diese Interaktionen schließlich zur Diapedese der Leukozyten (122). Der erste Vorgang kommt durch den hämodynamischen Effekt zu Stande. Die weiteren Vorgänge sind mediatorabhängig, das heißt, aktiviertes Endothel und Leukozyten beeinflussen sich gegenseitig. Aktivierte neutrophile Granulozyten setzen eine Reihe von Mediatoren frei (z.B. Sauerstoffradikale, Elastase, Kollagenasen, Myeloperoxidasen), die das Endothel angreifen, die Gefäßpermeabilität erhöhen und weiter Kaskadensysteme aktivieren (88, 190, 194).

#### **5.3.2.1 Temporär adhärente Leukozyten**

Auch im intakten Gewebe wird ein spontanes Leukozytenrolling beobachtet. Der Anteil der rollenden Leukozyten kann bis zu 45% der Gesamtleukozyten betragen („rolling pool“). Das Ausmaß hängt von der Art des untersuchten Gewebes ab. Janssen et al. stellten dieses Phänomen intravitalmikroskopisch an der Haut von gesunden Ratten und Mäusen fest und interpretierten dies als Bereitschaft der Leukozyten für eine jederzeitige Aktivierung des Immunsystems (101).

Mayrovitz et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen bei der Untersuchung intakter Haut von haarlosen Mäusen (133).

Unter unserer Versuchsanordnung wurde bereits zum Messzeitpunkt 0 Stunden, also vor Applikation des LPS, in allen Versuchsgruppen ein temporäres Adhärenieren der Leukozyten in postkapillären Venolen beobachtet. Im Durchschnitt waren das 7 Zellen pro Minute. Scalia et al. beschrieben in intestinalen Venolen des Darmes von Mäusen, 20 Minuten nach der Auslagerung des Darmes, ein „Baseline-Rolling“ von 15-20 Leukozyten pro Minute (167). Wir begannen die erste IVM ca. 15 Minuten nach der Auslagerung des Darmes, was die geringere Anzahl der rollenden Leukozyten erklären könnte.

Neben dem oben beschriebenen physiologischen Leukozytenrolling führt jedes operative Trauma zu einem erhöhten Leukozytenrolling. Aussagen zum spontanen Leukozytenrolling lassen sich im engeren Sinne nur an noninvasiven Präparationen, wie z.B. dem Nagelbett, der Haut, oder den Augen zuverlässig treffen. Fiebig et al. beschrieben bereits 5 Minuten nach Auslagerung des Mesenteriums von Kaninchen eine Akkumulation adhärenter neutrophiler Granulozyten, welche auch noch 30 Minuten danach zu verzeichnen war. Dabei konnten nach 5 Minuten durchschnittlich 8 und nach 30 Minuten durchschnittlich 24 Roller in den mesenterialen Venolen intravitalmikroskopisch nachgewiesen werden (65). Das Auslagern des Mesenteriums über 180 Minuten muss trotz supportiver Maßnahmen, wie Superfusion mit erwärmter Perfusionslösung, kürzestmöglicher Belichtung mit Fluoreszenzlicht und Vermeidung von Manipulation am präparierten Darm als starke Veränderung des physiologischen Milieus betrachtet werden und findet so seinen Ausdruck in diesen zum Teil pathologischen Reaktionen.

Allerdings änderte sich im Verlauf unserer Untersuchung in allen Versuchsgruppen der Rollerflow nicht. Warum dies so war wird in 5.3.2.2 näher diskutiert. Andere Autoren berichten über einen Anstieg der Anzahl rollender Leukozyten nach LPS-Gabe bei Ratten und Mäusen (94, 136). Schmidt et al. beschrieben intravitalmikroskopisch an Ratten eine Reduktion der Anzahl temporär adhärenter Leukozyten nach LPS Applikation, verbunden mit einer gleichzeitigen Erhöhung der Anzahl fest adhärenter Leukozyten (169).

### 5.3.2.2 Fest adhärente Leukozyten

In der Endotoxingruppe kam es auch in unserer Versuchsanordnung zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl der fest adhärenen Leukozyten, jedoch ohne Veränderung der Anzahl temporär adhärenen Leukozyten. Dies erscheint angesichts der sequenziellen Abfolge der Leukozytenaktivierung und der Zunahme der festen Adhärenz als paradox. Begründet werden kann dieser Effekt durch eine überproportionale und schnelle Ausprägung der festen Leukozytenadhärenz in der Mikrozirkulation. Durch die Endotoxingabe adhären die neutrophilen Granulozyten in einem solchen Ausmaß fest am Endothel, so dass kaum noch rollende Leukozyten beobachtet werden können. Diese Interpretation kann durch die LPS-induzierte Reduktion der Leukozytenzahl im peripheren Blut unserer Versuchstiere untermauert werden. Ähnliche Beobachtungen machten Baatz et al. 2 Stunden nach LPS-Applikation in Gefäßen der Uvea von Ratten. Es kam zu bis zu 30% vermindertem Leukozytenrolling, begleitet von einem Abfall der Leukozytenzahl im peripheren Blut. Bei langer Versuchsdauer (ca. 6 Stunden) schien es durch Aktivierung der Granulopoese wieder zu einem Anstieg der Leukozyten im peripheren Blut zu kommen, wobei eine Zunahme des Leukozytenrollings bei konstant erhöhter fester Leukozytenadhärenz zu verzeichnen war (11). Da unsere Versuchsanordnung nur 2 Stunden betrug, konnte dieser Effekt bei uns nicht beobachtet werden.

Zum Messzeitpunkt 0 Stunden unseres Versuches konnten wir ebenfalls ein bereits erhöhtes „Baseline-Sticking“ in allen Versuchsgruppen beobachten. Der Median lag bei 2 Zellen/100 µm Venolenlänge. Auch hier kann die oben erwähnte Theorie der Traumatisierung des Gewebes als Erklärung herangezogen werden. Fest adhärenen Leukozyten werden unter Normalbedingungen, d.h. Wachheit, Stressfreiheit, Abwesenheit von Pathogenen oder Testsubstanzen in der Regel nicht beobachtet (133). Kubes et al. stellten fest, dass unter Kontrollbedingungen etwa alle vier Minuten ein Leukozyt pro 100 µm Venolenlänge am mesenterialen Endothel von Katzen adhärert (113). Angaben anderer Autoren an mesenterialen Gefäßen von Ratten schwanken zwischen 2-6 fest adhärenen Leukozyten und sind ebenfalls mit unseren Ergebnissen vergleichbar (9, 181).

Nach 60 Minuten war in unserer unbehandelten Endotoxingruppe ein Anstieg der Anzahl der fest adhärenen Leukozyten auf ca. das 4fache des Ausgangswertes zu verzeichnen, dagegen lagen sowohl die Kontroll- als die NAC/TM-Gruppe im Verlauf konstant etwa bei Baseline-Werten.



Das vermehrte Adhärenzen der Leukozyten war nicht auf makrohämodynamische Veränderungen zurückzuführen, da es zum Zeitpunkt der Mikroskopie keine signifikanten Unterschiede im mittleren arteriellen Blutdruck zwischen der Kontroll- und den mit LPS behandelten Gruppen gab. Die von uns beobachtete Zunahme der am mesenterialen Gefäßendothel fest adhärenzen Leukozyten unter Endotoxinämie entspricht dabei Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, wenn man unterschiedliche LPS-Dosierungen und Maßeinheiten berücksichtigt. Seifge et al. stellten an mesenterialen Venolen von Ratten einen Anstieg der Adhärenz von Leukozyten auf 20/100  $\mu\text{m}$  Venolenlänge nach einer Bolusinjektion Endotoxin von 15 mg/kg KG fest (181). Kurose et al. beobachteten an mesenterialen Venolen von Ratten 12 Leukozyten/4000  $\mu\text{m}^2$  Venolenfläche nach 60 Minuten Endotoxinämie (2 mg/kg/h) (116).

Die Gabe der beiden Antioxidantien NAC und TM verminderte in unserer Versuchsreihe signifikant die feste Adhärenz der Leukozyten. Die beiden Antioxidantien haben unterschiedliche Wirkmechanismen, die sich in ihrer kombinierten Gabe ergänzend als protektiv in Bezug auf radikalischen Stress während Endotoxinämie herausstellten. Das Lazaroid TM hemmt die Lipidoxidation, bei der Lipidperoxide entstehen, die auf Granulozyten chemotaktisch wirken (86, 190). Bei der Hemmung dieses Vorganges müsste die Zahl adhärenter Leukozyten abnehmen, was auch mit den Ergebnissen unserer Untersuchungen korreliert. Daneben hemmt TM die Leukozytenadhärenz an IL-1 stimulierten Endothelzellen (142). Auch in anderen Studien am Mesenterium der Ratte konnte eine Reduktion der Leukozytenadhärenz bei Endotoxinämie durch Therapie mit diesem Lazaroid nachgewiesen werden (171). Daneben stabilisiert TM durch physikochemische Wechselwirkungen die Zellmembranen (46). Man nimmt an, dass eine membranstabilisierende Wirkung die Konformationsänderungen der Leukozyten behindert, die notwendig sind, damit die von ihnen exprimierten Integrine Adhäsivität erlangen (122, 187). Lazaroide werden auch als Radikalfänger bezeichnet. Radikale wie Wasserstoffperoxid und Hydroxyradikale aktivieren den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, der für die Synthese von Adhäsionsmolekülen, wie E-Selektin, ICAM-1 und V-CAM verantwortlich ist (50). Dies wird durch das Abfangen der Radikale minimiert.

NAC hebt den endogenen Antioxidantienstatus, hemmt oxidative Enzyme und wirkt somit auch über eine verminderte Synthese von Adhäsionsmolekülen. Daneben verhindert es eine IL-1 induzierte Gewebszerstörung und inhibiert die Freisetzung von TNF- $\alpha$ , dessen Bedeutung in 5.4.2 näher diskutiert wird (151, 203). In einer Studie von Schmidt et al. wurde ebenfalls über

eine verminderte Leukozytenadhäsion durch die Behandlung mit NAC von Ratten unter Endotoxinämie berichtet (175).

Eine antioxidative Therapie mit diesen beiden Antioxidantien erscheint demnach als sinnvoll und effektiv, um der pathologisch aktivierten Leukozyten-Endothel-Interaktion bei der Sepsis entgegenzuwirken.

## **5.4 Laborparameter**

### **5.4.1 Leukozytenzahl**

Definitionsgemäß zählen die Leukozytopenie ( $<4000/\text{ml}$ ) oder die Leukozytose ( $>12000/\text{ml}$ ) zu den Markern der Sepsis. Bei experimentellen Modellen mit LPS-Applikation kommt es in der Regel zunächst zu einer ausgeprägten Leukozytopenie (10, 16, 81). Sie gilt als ein Indikator für die Sepsis-Induktion (169). Diesem initialen Leukozytensturz kann sich infolge der Freisetzung von Leukozyten aus dem Knochenmark bei längerer Beobachtungszeit eine reaktive Leukozytose anschließen. Als Ursache für die passagere Leukozytopenie wird die endotoxininduzierte Leukozytenadhärenz in der Endstrombahn verschiedener Organe angenommen. Die Anzahl der im peripheren Blut vorhandenen Leukozyten repräsentiert ein Gleichgewicht zwischen jeweils neu gebildeten und den in der Mikrozirkulation adhärenenten Leukozyten (16).

In unserer Untersuchung nahm die Zahl der Leukozyten im peripheren Blut bei der Endotoxingruppe ab. Das korreliert mit unseren intravitalmikroskopischen Untersuchungen, in denen die Zahl der fest adhärenenten Leukozyten zunahm. Auch Schmidt et al. untersuchten an Ratten den Einfluss von LPS auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion und bestimmten die Anzahl der Leukozyten im Blut. Sie verzeichneten eine signifikante Abnahme der Leukozytenzahl im Blut und eine signifikante Zunahme der adhärenenten Leukozyten (172, 174). In der NAC/TM-Gruppe kam es ebenfalls zu einem Abfall der Leukozytenzahl im Blut. Jedoch konnten wir in dieser Gruppe intravitalmikroskopisch keinen Anstieg der Anzahl der fest adhärenenten Leukozyten beobachten. Eine Erklärung dafür wäre, dass die beobachtete Reduktion der festen Adhärenz der Leukozyten durch NAC/TM nur an mesenterialen Venolen untersucht wurde, so dass eine unvermindert gesteigerte Adhärenz, z.B. in den Gefäßen der

Lungenstrombahn, nicht auszuschließen ist. Daneben könnte es sein, dass zu dem Zeitpunkt der Untersuchung die Leukozyten bereits extravasiert waren.

Der Anstieg der Leukozytenzahl in der Kontrollgruppe nach 90 Minuten Versuchsdauer findet seine Erklärung darin, dass bereits die Traumatisierung durch den operativen Eingriff das Immunsystem der Ratten aktiviert. Der Stress, der für den Organismus trotz supportiver Maßnahmen und Narkose entsteht, führt zu einer vermehrten Freisetzung von Leukozyten z.B. aus den Lymphknoten, der Milz und dem Knochenmark. Jedoch ist diese Freisetzung aus den Leukozytenreservoirs begrenzt und führt nach längerer Versuchsdauer zunächst wieder zu einem Abfall der Leukozytenzahl im peripheren Blut, die Zellen migrieren für die Abwehrreaktion in das Gewebe.

#### **5.4.2 TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  gilt als initialer Mediator im septischen Geschehen, da die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen bereits wenige Minuten nach Beginn des Infektions- und Sepsisgeschehens dramatisch ansteigen. TNF- $\alpha$  triggert u.a. die Produktion und Ausschüttung der proinflammatorisch wirkenden Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8. Dies ist auch deutlich an unseren Ergebnissen der IL-1 $\beta$ - und der IL-6-Konzentrationen bei Endotoxinämie erkennbar.

TNF- $\alpha$  steigert außerdem die Adhärenz von PMNL an Endothelzellen durch granulozytäre und endotheliale Reaktionen und erhöht die Diapedese dieser Zellen durch das Endothel in umliegendes Gewebe. Eine Vielzahl von sekundär inflammatorischen Mediatoren, wie z.B. reaktive Sauerstoffspezies, werden durch TNF- $\alpha$  induziert (33, 75, 146). TNF- $\alpha$  hat eine relativ kurze Halbwertszeit und ist in seiner bioaktiven Form nur in einem kleinen diagnostischen Fenster nachweisbar (180). Für experimentelle Belange ist TNF- $\alpha$  jedoch ein idealer Indikator für die Sepsisinduktion und die Untersuchung einer antiinflammatorischen Therapie.

In unserem Versuchsmodell fanden wir nach 90 Minuten Endotoxinämie mit 10 mg/kg KG LPS TNF- $\alpha$ -Spitzenspiegel von ca. 1000 pg/ml in der Endotoxingruppe. Der Ausgangsspiegel von TNF- $\alpha$  lag in dieser Gruppe zum Messzeitpunkt 0 Stunden bei ca. 10 pg/ml. Das Ausmaß der TNF- $\alpha$ -Freisetzung nach LPS-Stimulation ist mit Ergebnissen anderer Autoren vergleichbar, die einen ca. 100fachen Anstieg der TNF- $\alpha$ -Konzentration beschrieben (12, 102). Boillot et al. beschrieben an Ratten in Folge einer Endotoxingabe von 50 mg/kg KG nach 60 Minuten einen

Spitzenspiegel von 3000 pg/ml. Die Ausgangsspiegel lagen in dieser Untersuchung unter der Nachweisgrenze (28).

In der Kontrollgruppe war in unserem Versuch nur ein leichter Anstieg der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen auf ca. 80 pg/ml zu beobachten. Ähnliche Werte wurden bei gesunden menschlichen Versuchspersonen gefunden (153). Man kann davon ausgehen, dass unsere invasive Methodik (Gefäßpräparation, Laparotomie und Darmmanipulation) Einfluss auf die TNF- $\alpha$ -Spiegel im Sinne einer operativ induzierten Inflamationsreaktion hatte. Die endotoxinbedingte Sensibilität des TNF- $\alpha$  konnte jedoch trotzdem bestätigt werden.

Die Werte der NAC/TM-Gruppe lagen tendenziell unter denen der Endotoxingruppe bei ca. 500 pg/ml. Zhang et al. beobachteten an Hunden unter Endotoxinämie von 2 mg/kg KG durch die Behandlung mit 150 mg/kg NAC signifikant erniedrigte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen von 0,14 ng/ml vs. 1,21 ng/ml in der Kontrollgruppe (203). Auch für Tirilizad Mesylat wurde in verschiedenen Studien an Hunden und Kälbern eine Verringerung der TNF- $\alpha$ -Freisetzung beschrieben (182, 202). In klinischen Studien wurde dagegen berichtet, dass NAC und TM keinen Einfluss auf die sepsisbedingte Erhöhung der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen der Patienten hatte. Eine klinische Studie von Spapen et al. an septischen Patienten konnte durch die Gabe von 150 mg/kg KG NAC keine signifikanten Verringerungen der erhöhten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen nachweisen (185). In einer anderen klinischen Studie über den Einfluss von TM auf die TNF- $\alpha$ -Spiegel nach koronarer Bypassoperation konnte ebenfalls keine Verringerung der inflammatorisch bedingten erhöhten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen festgestellt werden (62).

Eventuell könnte sich auch klinisch die kombinierte Gabe der beiden Antioxidantien NAC und TM durch die unterschiedlichen Wirkmechanismen, die sich in ihrer kombinierten Gabe ergänzen, als protektiv in Bezug auf erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen und deren Folgen herausstellen. NAC hat als Substrat der Gluthathionsynthese wichtige antioxidative Eigenschaften. Durch die Auffüllung intrazellulärer Gluthathionspiegel kommt es zu einer Radikalfängerwirkung. Freie Sauerstoffradikale und der Verbrauch der Glutathionvorräte führen zu einer erhöhten Freisetzung von TNF- $\alpha$ , welches wiederum die intrazellulären Gluthathionspiegel erniedrigt. Dieser circulus vitiosus kann durch NAC durchbrochen werden (14). Die Wirkung des TM kann ebenfalls auf seine Stellung als Radikalfänger zurückgeführt werden.

TNF- $\alpha$  induziert u.a. die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ b. Dieser Faktor bewirkt in Endothelzellen und Leukozyten eine Expression weiterer Zytokine, insbesondere auch von Adhäsionsmolekülen. Dies führt zur verstärkten Leukozytenadhärenz am Endothel (27). Wie bereits oben diskutiert, verringerte NAC in der Kombination mit TM in unserem Versuch die feste Leukozytenadhärenz signifikant im Vergleich zur Endotoxingruppe.

Die geringeren TNF- $\alpha$ -Spiegel in der NAC/TM-Gruppe könnten diesen Effekt direkt erklären. Weniger TNF- $\alpha$  induziert weniger NF- $\kappa$ b und somit kommt es zu einer geringeren Expression von Adhäsionsmolekülen und damit zu einer geringeren Leukozyten-Endothel-Interaktion. Daneben können die erhöhten Spiegel von IL-10 in unserer NAC/TM-Gruppe mit der verringerten Freisetzung von TNF- $\alpha$  in dieser Gruppe in Zusammenhang gebracht werden, da IL-10 die Freisetzung von TNF- $\alpha$  hemmt (180).

Die nach 90 Minuten bis 180 Minuten wieder stark abfallenden TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den mit LPS behandelten Gruppen lässt sich durch die kurze Halbwertszeit des TNF- $\alpha$  erklären, da die LPS-Infusion nach 120 Minuten gestoppt wurde und somit die Induktion der TNF- $\alpha$ -Produktion bzw. die Freisetzung durch den Endotoxin-Trigger wegfiel.

### **5.4.3 Interleukin-1 $\beta$**

IL-1 $\beta$  gehört wie TNF- $\alpha$  zu den ersten Mediatoren, die während der Sepsis in erhöhten Konzentrationen auftreten. Gemeinsame Wirkungen sind z.B. eine Stimulierung der Lymphozytenproliferation, Fieber und die Produktion von IL-6 und IL-8 (25). Daneben fördern diese beiden Zytokine die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Zelloberflächen. Im peripheren Gefäßbett wird durch IL-1 $\beta$  die Synthese sekundärer Mediatoren wie PAF, Prostaglandinderivate und Nitridoxid induziert (61). IL-1 $\beta$  kann beim Zelluntergang in erhöhter Konzentration im Serum gemessen werden und hat wie TNF- $\alpha$  nur eine kurze Halbwertszeit von 6-10 Minuten. An gesunden Probanden konnten nach Infusion von Endotoxin erhöhte Konzentrationen von IL-1 $\beta$  gemessen werden, die allerdings unter denen von TNF- $\alpha$  lagen (47). IL-1 $\beta$  spielt wie TNF- $\alpha$  eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der gestörten Mikrozirkulation während der Sepsis.

So konnten Yi et al. in einem Versuch an Ratten nachweisen, dass jeweils durch die Applikation von LPS, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in den Musculus abdominis rectus eine erhöhte Gefäßpermeabilität mit konsekutiver Ödembildung sowie eine erhöhte Diapedese von Neutrophilen in das Gewebe auftraten (199).

In unserer Untersuchung kam es zu einem signifikanten Anstieg der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in den mit LPS behandelten Gruppen, während in der Kontrolle keine Veränderungen der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen zu verzeichnen waren. Die Antioxidantien NAC und TM hatten keinen Einfluss auf die erhöhte IL-1 $\beta$ -Synthese bei Endotoxinämie. In der Literatur gibt es keine vergleichbaren Studien, allerdings konnte durch die Gabe von NAC in einer In-vitro-Untersuchung von mononukleären Zellen die LPS induzierte Produktion von IL-1 $\beta$  signifikant verringert werden (158). Untersuchungen mit TM in Bezug auf LPS induzierte IL-1 $\beta$ -Produktion liegen in der Literatur nicht vor.

#### **5.4.4 Interleukin-6**

Der Blutspiegel von IL-6 korreliert beim septischen Schock mit der Prognose der Patienten und eignet sich als Marker für den Schweregrad der Erkrankung (33, 163, 189). IL-6 ist durch seine proinflammatorische Wirkung für die klinischen Zeichen der SIRS mit verantwortlich (33). In unserer Studie zeigte sich nach 1,5 Stunden in allen LPS behandelten Gruppen ein signifikanter Anstieg der IL-6-Konzentrationen im Serum der Ratten. Dies wird in der Literatur bestätigt, nach der Endotoxin die Bildung von IL-6 in Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten stimuliert (25, 180). Zum Messzeitpunkt 0 Stunden unseres Versuches lagen die IL-6-Spiegel bei allen Gruppen durchschnittlich bei 37 pg/ml. Im Laufe des Versuches stiegen die IL-6-Spiegel in der Kontrollgruppe auf bis zu 128 pg/ml an, während sich die IL-6-Spiegel in der Endotoxin- und der NAC/TM-Gruppe auf ca. 5500-7700 pg/ml erhöhten. Der IL-6-Anstieg in der Kontrollgruppe kann auf das Trauma durch die Präparation an Gefäßen und Darm zurückgeführt werden. Jedes Trauma kann zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-6 führen, die mit dem Ausmaß des Gewebetraumas korreliert (51, 149). Der erheblichere Anstieg der IL-6-Konzentrationen in den mit LPS behandelten Gruppen ist somit durch die Endotoxinämie bedingt. Kuhns, Alvord und Gallin stellten nach i.v. Injektion von Endotoxin bei gesunden Probanden einen IL-6-Peak nach 4 Stunden fest, während der von TNF- $\alpha$  bereits nach 1,5-2 Stunden auftrat (115).

Auch in unserer Versuchsanordnung scheint der IL-6-Peak erst zum späteren Zeitpunkt aufzutreten, da am Messzeitpunkt 3 Stunden die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im Vergleich zu den IL-6-Konzentrationen wieder deutlich abgefallen waren, während die IL-6-Spiegel am Messzeitpunkt 3 Stunden weiter deutlich erhöht blieben.

NAC und TM hatten in unserer Studie keinen Einfluss auf die vermehrte Produktion von IL-6. Unserer Versuchsanordnung ähnelnde Studien liegen in der Literatur nicht vor. Allerdings ergab eine klinische Studie von Spapen et al. an septischen Patienten, dass NAC keinen signifikanten Effekt auf die sepsisbedingte erhöhte Plasmakonzentration von IL-6 hatte (185). In einer anderen Untersuchung des Einflusses von TM auf die IL-6-Spiegel nach koronarer Bypassoperation konnte ebenfalls keine Verringerung der erhöhten IL-6-Konzentrationen festgestellt werden (62).

Auf der Oberfläche von PMNL verursacht IL-6 eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen, die zur Migration der Leukozyten in das entzündete Gewebe führen (183). Die Stimulation von Endothelzellen durch IL-6 induziert eine Expression von spezifischen endothelialen Adhäsionsmolekülen (132). In unserer Studie war die Anzahl der fest adhärenen Sticker in der NAC/TM-Gruppe im Vergleich zu der Endotoxingruppe signifikant geringer. Allerdings waren die IL-6-Spiegel in der NAC/TM-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Somit schienen in der NAC/TM-Gruppe die beiden Antioxidantien trotz erhöhter IL-6-Spiegel die Leukozyten-Endothel-Interaktion verringern zu können. Ein ähnliches Ergebnis wurde bereits in 5.4.3 bezüglich IL-1 $\beta$  diskutiert.

#### **5.4.5 Interleukin-10**

IL-10 wirkt als antiinflammatorischer Mediator, indem es die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine, vor allem von TNF- $\alpha$  und IL-1, aus Monozyten und Makrophagen hemmt (180). In unserer Untersuchung stieg die Konzentration von IL-10 in der Kontrollgruppe zwar signifikant an, lag aber im Vergleich zu den mit LPS behandelten Gruppen signifikant niedriger als diese. In der NAC/TM-Gruppe dagegen kam es nach 90 Minuten zu einem signifikanten Anstieg der IL-10-Spiegel von ca. 14 pg/ml auf 300 pg/ml. Auch in der Endotoxingruppe kam es nach 90 Minuten zu einem signifikanten Anstieg der IL-10-Spiegel von ca. 6 pg/ml auf ca. 223 pg/ml. Zum Messzeitpunkt 3 Stunden lagen in den mit LPS behandelten Gruppen signifikant höhere IL-10-Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe vor.

In der Literatur existieren keine vergleichbaren Studien zu IL-10-Spiegeln während Endotoxinämie bei Ratten. IL-10 ist einer der ersten antiinflammatorischen Mediatoren, deren Spiegel während der Sepsis im Serum erhöht sind (180). Dies korreliert mit unserem Ergebnis. In der NAC/TM-Gruppe waren tendenziell höhere IL-10-Spiegel als in der Endotoxingruppe messbar, was mit der in 5.4.2 diskutierten, tendenziell verringerten TNF- $\alpha$ -Produktion in der NAC/TM-Gruppe gut korreliert.

## **5.5 Hämodynamik**

Obwohl laut Definition von SIRS, Sepsis und septischem Schock hämodynamische Veränderungen pathognomonisch für den Krankheitsverlauf sind (34), stellen Untersuchungen der Mikrozirkulation besondere Ansprüche an das hämodynamische Profil des Studiendesigns. Um die Veränderungen der mesenterialen Leukozyten-Endothel-Interaktion durch Endotoxinämie angemessen beurteilen zu können, ist eine Abgrenzung von makrohämodynamischen Veränderungen (z.B. systemische Hypotension) notwendig (11). Die Scherkräfte, verursacht durch den Blutfluss, haben einen erheblichen Einfluss auf die Leukozytenadhärenz. Der mittlere arterielle Blutdruck beeinflusst die Blutflussgeschwindigkeit, welche nach der Newtonschen Formel die Scherkräfte bestimmt (137).

Da in unserer Untersuchung die Endotoxin-spezifischen Veränderungen in der mesenterialen Mikrozirkulation im Vordergrund standen, wählten wir ein Versuchsdesign, bei dem während der Endotoxinapplikation und bei adäquater Volumensubstitution im Wesentlichen ein normotensiver Zustand der Versuchstiere aufrecht erhalten werden konnte.

### **5.5.1 Mittlerer arterieller Blutdruck**

Der septische Schock ist durch Hypotonie definiert, bei der trotz angemessener Volumensubstitution die hypotensive Kreislauflage nur durch vasokonstriktive Substanzen adäquat behandelt werden kann (34).

Die Veränderungen der Mikrozirkulation sind durch pathologische Vasodilatation in Kombination mit Gebieten unzureichender Vasokonstriktion charakterisiert.



Sepsismediatoren, wie z.B. TNF- $\alpha$  und IL-1 wirken dabei vasodilatorisch, während Substanzen wie Noradrenalin und Leukotriene vasokonstriktorische Funktionen einnehmen (74, 95).

In unserer Untersuchung kam es eine halbe Stunde nach Beginn der LPS-Applikation in den mit LPS behandelten Gruppen zu einem tendenziellen Abfall des mittleren arteriellen Blutdruckes. Allerdings fand sich in diesen beiden Gruppen auch ein niedrigerer Ausgangs-MAP im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der MAP blieb in den mit Endotoxin behandelten Gruppen nach dem initialen Abfall konstant bei 110 mmHg. In der Kontrollgruppe lag der MAP bis zur 90. Minute tendenziell höher bei ca. 130 mmHg.

Ein Einfluss der von uns eingesetzten Antioxidantien auf Veränderungen der Hämodynamik war primär nicht zu erwarten. In der Literatur existieren unterschiedliche Beobachtungen hinsichtlich des Einflusses der Antioxidantien auf die Hämodynamik. Zhang et al. konnten an Hunden bei Endotoxinämie einen positiven Effekt von Tirilazad Mesylat auf den MAP feststellen (202), nicht aber für NAC (204). McKechnie et al. untersuchten an Ratten den Einfluss von Alpha-Tocopherol, reduziertem Glutathion, Allopurinol und SOD auf die metabolischen und kardiovaskulären Reaktionen nach Endotoxingabe. Keine der eingesetzten Substanzen hatte einen signifikanten Einfluss auf die Hypotension (134).

Festzuhalten bleibt, dass sich die Gruppen in Bezug auf die Makrohämodynamik zum Zeitpunkt der Mikroskopie nicht signifikant voneinander unterschieden. Somit sind die Ergebnisse der Untersuchung der Leukozyten-Endothel-Interaktion nicht durch die Hämodynamik beeinflusst.

### **5.5.2 Herzfrequenz**

Ein Definitionskriterium für die SIRS bzw. Sepsis ist ein Anstieg der Herzfrequenz beim Menschen über 90 Schläge pro Minute (34). Veränderungen der Herzfrequenz, wie auch des mittleren arteriellen Blutdruckes, dienen in unserem Modell auch als Kontrolle der Induktion einer Endotoxinämie.

Wie auch diverse andere Untersuchungen unter Anwendung einer ähnlichen LPS-Dosis stellten auch wir einen Herzfrequenzanstieg nach dem Beginn der LPS-Applikation fest (16, 198). Alle mit LPS behandelten Gruppen zeigten 90 Minuten nach Beginn der Endotoxinämie einen Anstieg der Herzfrequenz auf ca. 390/min. Dabei hatte die NAC/TM-Gruppe zum Messzeitpunkt

0 Stunden einen niedrigeren Ausgangswert der Herzfrequenz gegenüber der Kontroll- und Endotoxingruppe. Nach 30 Minuten Endotoxinämie war ein starker Herzfrequenzanstieg von ca. 330/min auf 370/min zu beobachten. Die Herzfrequenz der Kontrollgruppe blieb ab Versuchsbeginn stabil bei etwa 360/min, fiel allerdings nach 120 Minuten Versuchsdauer auf 330/min ab.

Xu et al. beschrieben an Ratten unter Endotoxinämie (5 mg/kg KG LPS) einen Anstieg der Herzfrequenz und ein erhöhtes Herzminutenvolumen und zeigten somit, dass eine hyperdynamische Kreislaufphase bestand (198). Bei der Applikation höherer Dosen von LPS - bis zu 40 mg/kg KG - in Bolusform kommt es in der Regel zu einer hypodynamischen Kreislaufsituation (41, 170). Bei geringeren Bolusgaben stellt sich zunächst ein initial hyperdynamisches Kreislaufbild ein, welches erst nach mehr als 4 Stunden in eine hypodynamische Phase übergeht (169).

Bezüglich unserer beiden eingesetzten Antioxidantien ließ sich keine Veränderung der Herzfrequenz im Vergleich zur Endotoxingruppe feststellen und war auch nicht in der Literatur beschrieben. Vielmehr diente auch dieser Parameter der Überprüfung der Sepsisinduktion durch Endotoxin.

### **5.5.3 Atemfrequenz**

Unter septischen Bedingungen kommt es häufig zu einer akuten respiratorischen Insuffizienz. Die Leukozyten-Endothel-Interaktion führt zu Veränderungen in der pulmonalen Mikrozirkulation. Perfusionsstörungen und Störungen im alveolar-kapillären Gasaustausch treten auf. Dadurch sinkt die Compliance der Lunge, und die zu leistende Atemarbeit steigt an (190).

Tachypnoe und Hypokapnie sind frühe klinische Zeichen weitere Kriterien für die Sepsisdefinition (38). Normalerweise wird der in der Sepsis anfallende Überschuss saurer Metabolite dadurch respiratorisch reguliert und ausgeglichen.

In dieser Arbeit wurde lediglich die Atemfrequenz untersucht, bei der sich weder in der Kontroll- noch in den Medikamentengruppen signifikante Veränderungen der Atemfrequenz ergaben. Aufgrund starker Schwankungen der Atemfrequenz in allen Versuchsgruppen über den Versuchszeitraum lassen sich keine konkreten Aussagen formulieren. In der Literatur liegen keine vergleichbaren Untersuchungen vor.

## 6 Zusammenfassung

Trotz der Fortschritte der Medizin in den letzten Jahren weisen die Sepsis und das konsekutive Multiorganversagen eine nahezu unverändert hohe Letalität sowie eine ansteigende Inzidenz auf. Auf operativen Intensivstationen stellt die Sepsis die häufigste Todesursache dar. Für die Entwicklung des MODS gelten Alterationen im Bereich der Mikrozirkulation als ursächlich. Man geht davon aus, dass aktivierte Leukozyten unter anderem Sauerstoffradikale freisetzen, die eine entscheidende Rolle bei der Zerstörung der endothelialen Integrität einnehmen.

Die Behandlung von Organdysfunktionen durch eine Antagonisierung schädigender Mediatoren (wie z.B. reaktive Sauerstoffspezies) stellt ein Prinzip der adjunktiven Sepsis-Therapie dar. Die antioxidativ wirkenden Substanzen N-Acetylcystein und Tirilazad Mesylat, die durch unterschiedliche Wirkmechanismen der oxidativen Schädigung von Organen entgegenwirken, haben bereits in mehreren Studien positive Effekte auf die Mikrozirkulation gezeigt.

Die Beeinflussung der mesenterialen Mikrozirkulation, insbesondere der Plasmaextravasation und der Leukozyten-Endothel-Interaktion, standen im Mittelpunkt dieser Arbeit. Ziel dieser tierexperimentellen Untersuchung war es, die beiden Antioxidantien NAC und TM hinsichtlich ihrer Wirksamkeit bei kombinierter Gabe zu untersuchen.

Die Untersuchung mikrozirkulatorischer Störungen ist unter klinischen Bedingungen nur beschränkt möglich, daher wählten wir ein Tiermodell an der Ratte. Mit Hilfe dieses Modelles wurde der Effekt der kombinierten Gabe von NAC und TM auf die mesenteriale Mikrozirkulation, auf die systemische Freisetzung von Mediatoren (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10) und auf paraklinische Parameter, wie die Leukozytenzahl, unter einer Lipopolysaccharid-belastung von 10 mg/kg KG untersucht. Die Beurteilung der mesenterialen Mikrozirkulation erfolgte mittels Intravitalmikroskopie. Hierbei wurde das Ausmaß der Leukozytenadhärenz am Endothel der mesenterialen Venolen als Maß für die Leukozytenaktivierung und die Plasmaextravasation als Parameter für die Endotheldysfunktion bestimmt.

In unseren intravitalmikroskopischen Untersuchungen stellten wir fest, dass während 2 Stunden Endotoxinämie die endotoxinbedingte Zunahme der Plasmaextravasation an mesenterialen Venolen von Ratten durch die kombinierte Gabe von NAC und TM nicht signifikant beeinflusst werden konnte.

Im Gegensatz dazu kam es zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der fest adhärennten Leukozyten in der NAC/TM-Gruppe im Vergleich zur LPS-Gruppe. Die tendenziell erhöhte Plasmaextravasation unterstützt die Hypothese, dass leukozytenunabhängige Mechanismen für diesen Vorgang existieren.

Durch die kombinierte Gabe von NAC und TM konnte die endotoxininduzierte Freisetzung von  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-10}$  und die endotoxinbedingte Leukopenie nicht signifikant beeinflusst werden.

## Literaturverzeichnis

1. Abu AI, Ajikobi DO, Bachelard H, Cupples WA, Salevsky FC: Responses of mesenteric and renal blood flow dynamics to acute denervation in anesthetized rats; *Am J Physiol.* 1998, 275 (5), S.R1543-R1552
2. Aderka D, Le JM, Vilcek J: IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice; *J Immunol.* 1989, 143 (11), S.3517-3523
3. Ahrenholz DH, Simmons RL: Fibrin in peritonitis. Beneficial and adverse effects of fibrin in experimental E.coli peritonitis; *Surgery.* 1980, 88 (1), S.41-47
4. Ammons WS, Kung AH: Recombinant amino terminal fragment of bactericidal/permeability-increasing protein prevents hemodynamic responses to endotoxin; *Circ Shock.* 1993, 41, S.176-184
5. Anderson RN: Leading Causes for 2000. National Vital Statistics Reports; Hrsg.: CDC Atlanta: Band 50. 2002 S.86
6. Angus Dc, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care; *Crit Care Med.* 2001, 29 (7), S.1303-1310
7. Angus DC, Wax RS: Epidemiology of sepsis: An update; *Crit Care Med.* 2001, 29 (7 Suppl), S.S109-S116
8. Arfors KE, Lundberg C, Lindbom L, Lundberg K, Beatty PG, Harlan JM: A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and plasma leakage in vivo; *Blood.* 1987, 69 (1), S.338-340
9. Arndt H, Palitzsch KD, Anderson DC, Rusche J, Grisham MB, Granger DN: Leucocyte-endothelial cell adhesion in a model of intestinal inflammation; *Gut.* 1995, 37 (3), S.374-379
10. Arvidsson S, Falt K, Marklund S, Haglund U: Role of free oxygen radicals in the development of gastrointestinal mucosal damage in Escherichia coli sepsis; *Circ Shock.* 1985, 18 (4), S.383-393
11. Baatz H, Pleyer U, Thiel HJ, Hammer C: In Vivo Study of Leukocyte-Endothelium Interaction in Endotoxin-Induced Uveitis; *Invest Ophtalmol Vis Sci.* 1995, 36, S.1960-1967
12. Bahrami S, Redl H, Leichtfried G, Yu Y, Schlag G: Similar cytokine but different coagulation responses to lipopolysaccharide injection in D-galactosamine-sensitized versus nonsensitized rats; *Infect Immun.* 1994, 62 (1), S.99-105
13. Baker JW, Deitch EA, Li M, Berg RD, Specian RD: Hemorrhagic shock induces bacterial translocation from the gut; *J Trauma.* 1988, 28 (7), S.896-906
14. Bakker J, Zhang H, Depierreux M, van Asbeck S, Vincent J: Effects of N-acetylcysteine in endotoxic shock; *Crit Care .* 1994, 9 (4), S.236-243

15. Balk RA: Severe sepsis and septic shock. Definitions, epidemiology, and clinical manifestations; Crit Care Clin . 2000, *16* (2), S.179-192
16. Barroso AJ, Schmid SG, Zweifach BW, Mathison JC: Polymorphonuclear neutrophil contribution to induced tolerance to bacterial lipopolysaccharide; Am Heart Assoc. 1991, *69* (5), S.1196-1206
17. Bauer M: Pathophysiologie der Sepsis; Anaesthesist . 1996, *45* (4), S.312-322
18. Bazil V, Strominger JL : Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes; J Immunol . 1991, *147* (5), S.1567-1574
19. Berg RD: Bacterial translocation from the gastrointestinal tract; Trends Microbiol. 1995, *3* (4), S.149-154
20. Bernard GR, Lucht WD, Niedermeyer ME, Snapper JR, Ogletree ML, Brigham KL: Effect of N-acetylcysteine on the pulmonary response to endotoxin in the awake sheep and upon in vitro granulocyte function; J Clin Invest. 1984, *73*, S.1772-1784
21. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ: Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis; N Engl J Med . 2001, *344* (10), S.699-709
22. Beutler B, Grau GE: Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases; Crit Care Med . 1993, *21* (10 Suppl), S.S423-S435
23. Beutler B, Poltorak A: Sepsis and evolution of the innate immune response; Crit Care Med . 2001, *29* (7 Suppl), S.S2-S6
24. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone-MA J, Seed B: Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: An inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins; Science. 1989, *243* (4895), S.1160-1165
25. Blackwell TS, Christman JW : Sepsis and cytokines: Current status; Br J Anaesth. 1996, *77* (1), S.110-117
26. Bochud PY, Calandra T: Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment; Brit Med J . 2003, *326* (7383), S.262-266
27. Böhler H, Qiu F, Zimmermann T, Zhang Y, Jllmer T, Mannel D, Bottiger BW, Stern DM, Waldherr R, Saeger HD, Ziegler R, Bierhaus A, Martin E, Nawroth PP: Role of NFkappaB in the mortality of sepsis ; J Clin Invest . 1997, *100* (5), S.972-985
28. Boillot A, Massol J, Maupoil V, Grelier R, Bernard B, Capellier G, Berthelot A, Barale F: Myocardial and vascular adrenergic alterations in a rat model of endotoxin shock: reversal by an anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody ; Crit Care Med. 1997, *25* (3), S.504-511
29. Bone RC: Immunologic dissonance: A continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS); Ann Intern Med . 1996, *125* (8), S.680-687
30. Bone RC: Let's agree on terminology: Definitions of sepsis; Crit Care Med . 1991, *19* (7) , S.973-976

31. Bone RC: The Pathogenesis of Sepsis; *Ann Intern Med* . 1991, *115* (6), S.457-469
32. Bone RC: Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS; *Crit Care Med* . 1996, *24* (7), S.1125-1128
33. Bone RC: Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation; *Crit Care Med*. 1996, *24* (1), S.163-172
34. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine; *Chest*. 1992, *101* (6), S.1644-1655
35. Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA: A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock; *N Engl J Med*. 1987, *317* (11), S.653-658
36. Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA: Sepsis syndrome: A valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group; *Crit Care Med*. 1989, *17* (5), S.389-393
37. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA : Sepsis: A new hypothesis for pathogenesis of the disease process; *Chest*. 1997, *112* (1), S.235-243
38. Bone RC, Sprung CL, Sibbald WJ : Definitions for sepsis and organ failure; *Crit Care Med* . 1992, *20* (6), S.724-726
39. Bonfanti R, Furie BC, Furie B, Wagner DD: PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells; *Blood* . 1989., *73* (5) , S.1109-1112
40. Bouvier C, Guc MO, Furman BL, Parratt JR: Platelet activating factor impairs pressor responses to noradrenaline in the anaesthetized rat but does not mediate endotoxin-induced hyporeactivity; *Circ Shock* . 1994, *42* (1), S.14-19
41. Brackett DJ, Schaefer CF, Tompkins P, Fagraeus L, Peters LJ, Wilson MF: Evaluation of cardiac output, total peripheral vascular resistance, and plasma concentrations of vasopressin in the conscious, unrestrained rat during endotoxemia; *Circ Shock*. 1985, *17* (4), S.273-284
42. Browne MK, Leslie GB : Animal models of peritonitis; *Surg Gynecol Obstet* . 1976, *143* (5), S.738-740
43. Bruin KF, von der Mühlen MAM, van Deventer DJH : Endotoxemia and Sepsis: Important Roles for Lipopolysaccharide Binding Protein and CD14 in Endotoxin Signal Transduction; *Sepsis - current perspectives in pathophysiology and therapy*. Berlin Heidelberg New York, Springer Verlag, 1994 S.53-60
44. Brunkhorst FM: Definition und Diagnose der Sepsis nach aktuellen Kriterien; *Klinikerzt*. 2004, *33* (6), S.167-172
45. Brunkhorst FM: Sepsis fordert viel mehr Todesopfer als gedacht; *Gesundheitsforschung: Forschung für den Menschen*. 2004, *17*, S.2-4

46. Buttgereit F, Hiepe F, Burmester GR : Das therapeutische Potential der Lazaroide (21-Aminosteroide); Dtsch med Wschr. 1997, 122 (44), S.1363-1367
47. Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA, Michie HR, Stanford GG, van der Meer JW, Endres S, Lonnemann G, Corsetti J, Chernow B, et al.: Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever ; J Infect Dis. 1990, 161 (1), S.79-84
48. Carrico CJ, Meakins JL, Marshall JC, Fry D, Maier RV: Multiple-organ-failure syndrome; Arch Surg . 1986, 121 (2), S.196-208
49. Chen H, Xu D, Qi S, Aboujaoude M, Senechal J, Daloze P: 21-Aminosteroid lipid peroxidation inhibitor U74389G protects the small bowel in the rat against warm and cold ischemia damage ; Transplant Proc. 1994, 26, S.1483-1484
50. Christman JW, Lancaster LH, Blackwell TS : Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy ; Intensive Care Med . 1998, 24 (11), S.1131-1138
51. Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Groote D, Franchimont P, Lamy M: Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity; Ann Surg. 1992, 215 (4), S.356-62
52. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE : Endotoxemia in human septic shock; Chest . 1991, 99 (1), S.169-175
53. Das UN: Critical advances in septicemia and septic shock ; Crit Care . 2000, 4 (5) , S.290-296
54. De-Carvalho H, Matos JA, Bouskela E, Svensjo E: Vascular permeability increase and plasma volume loss induced by endotoxin was attenuated by hypertonic saline with or without dextran; Shock. 1999, 12 (1), S.75-80
55. Deitch EA: Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy ; Ann Surg . 1992, 216 (2), S.117-134
56. Deitch EA, Bridges RM: Effect of stress and trauma on bacterial translocation from the gut; J Surg Res. 1987, 42 (5), S.536-542
57. Deitch EA, Ma L, Ma WJ, Grisham MB, Granger DN, Specian RD, Berg RD: Inhibition of endotoxin-induced bacterial translocation in mice; J Clin Invest . 1989, 84 (1), S.36-42
58. Deitch EA, Specian RD, Berg RD: Endotoxin-induced bacterial translocation and mucosal permeability: Role of xanthine oxidase, complement activation, and macrophage products ; Crit Care Med. 1991, 19 (6), S.785-791
59. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM : Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock; Crit Care Med. 2004, 32 (3) , S.858-873
60. Dunzendorfer S, Lee HK, Soldau K, Tobias PS: TLR4 is the signaling but not the lipopolysaccharide uptake receptor; J Immunol . 2004, 173 (2), S.1166-1170



61. Engelberts I, Moller A, Leeuwenberg JF, van der Linden CJ, Buurman WA : Administration of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) inhibitors after exposure to TNF alpha prevents development of the maximal biological effect: An argument for clinical treatment with TNF alpha inhibitors; *J Surg Res.* 1992, *53* (5), S.510-514
62. Engelhardt L: Hrsg.: Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin: Einfluss von Methylprednisolon und Tirilazad Mesylat auf immunologische Parameter nach koronarer Bypassoperation - eine placebokontrollierte Studie. Dissertation. 2001
63. Eversole RR, Smith SL, Beuving LJ, Hall ED: Protective effect of the 21-aminosteroid lipid peroxidation inhibitor tirilazad mesylate (U74006F) on hepatic endothelium in experimental hemorrhagic shock; *Circ Shock.* 1993, *40* (2), S.125-131
64. Fenton MJ, Golenbock DT: LPS-binding proteins and receptors ; *J Leukoc Biol.* 1998, *64* (1), S.25-32
65. Fiebig E, Ley K, Arfors KE : Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery; *Int J Microcirc Clin Exp .* 1991, *10* (2), S.127-144
66. Fink MP: Leaky gut hypothesis: A historical perspective; *Crit Care Med .* 1990, *18* (5), S.579-580
67. Fink MP, Antonsson JB, Wang HL, Rothschild HR: Increased intestinal permeability in endotoxic pigs. Mesenteric hypoperfusion as an etiologic factor; *Arch Surg .* 1991, *126* (2), S.211-218
68. Fink MP, Heard SO: Laboratory models of sepsis and septic shock; *J Surg Res.* 1990, *49* (2), S.186-196
69. Fong Y, Lowry SF: Tumor necrosis factor in the pathophysiology of infection and sepsis; *Clin Immunol Immunopathol.* 1990, *55* (2), S.157-170
70. Fong Y, Moldawer LL, Shires GT, Lowry SF : The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical injury; *Surg Gynecol Obstet.* 1990, *170* (4), S.363-378
71. Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V, Espevik T, Finlay BB, Wright SD: Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide; *J Exp Med.* 1992, *176* (6), S.1665-1671
72. Friedman G, Berlot G, Kahn RJ, Vincent JL: Combined measurements of blood lactate concentrations and gastric intramucosal pH in patients with severe sepsis; *Crit Care Med.* 1995, *23* (7) , S.1184-1193
73. Fukumura D, Miura S, Kurose I, Higuchi H, Suzuki H, Ebinuma H, Han JY, Watanabe N, Wakabayashi G, Kitajima M, Ishii H: IL-1 is an important mediator for microcirculatory changes in endotoxin-induced intestinal mucosal damage; *Dig Dis Sci .* 1996, *41* (12), S.2482-2492
74. Ghosh S, Latimer RD, Gray BM, Harwood RJ, Oduro A: Endotoxin-induced organ injury; *Crit Care Med .* 1993, *21* (2 Suppl) , S.S19-S24

- 
75. Giroir BP: Mediators of septic shock: New approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade; *Crit Care Med.* 1993, *21* (5), S.780-789
  76. Goode HF, Webster NR: Free radicals and antioxidants in sepsis; *Crit Care Med.* 1993, *21* (11), S.1770-1776
  77. Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA: Ischemia-reperfusion injury: Role of oxygen-derived free radicals; *Acta Physiol Scand.* 1986, *Suppl 548*, S.S47-S63
  78. Granger DN, Kubes P: The microcirculation and inflammation: Modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion ; *J Leukoc Biol.* 1994, *55* (5) , S.662-675
  79. Granger DN, Richardson PD, Kvietys PR, Mortillaro NA: Intestinal blood flow ; *Gastroenterology.* 1980, *78* (4), S.837-863
  80. Gray PW, Corcorran AE, Eddy-RL J, Byers MG, Shows TB: The genes for the lipopolysaccharide binding protein (LBP) and the bactericidal permeability increasing protein (BPI) are encoded in the same region of human chromosome 20; *Genomics.* 1993, *15* (1), S.188-190
  81. Grisham MB, Everse J, Janssen HF: Endotoxemia and neutrophil activation in vivo; *Am J Physiol.* 1988, *254* (5 Pt 2), S.H1017-H1022
  82. Grotz M, Regel G, Bastian L, Weimann A, Neuhoﬀ K, Stalp M, Tscherne H : Der Darm als zentrales Organ in der Entwicklung des Multiorganversagens (MOV) nach schwerem Trauma- Pathophysiologie und therapeutische Ansätze; *Zentralbl Chir.* 1998., *123* (3), S.205-217
  83. Grum CM, Fiddian Green RG, Pittenger GL, Grant BJ, Rothman ED, Dantzker DR: Adequacy of tissue oxygenation in intact dog intestine; *J Appl Physiol.* 1984, *56* (4), S.1065-1069
  84. Haglund U, Bulkley GB, Granger DN: On the pathophysiology of intestinal ischemic injury. Clinical review ; *Acta Chir Scand.* 1987, *153* (5-6), S.321-324
  85. Hall ED: Lipid antioxidants in acute central nervous system injury; *Ann Emerg Med.* 1993, *22* (6), S.1022-1027
  86. Hall ED, McCall JM, Means ED: Therapeutic potential of the lazaroids (21-aminosteroids) in acute central nervous system trauma, ischemia and subarachnoid hemorrhage; *Adv Pharmacol.* 1994, *28*, S.221-268
  87. Hampton RY, Golenbock DT, Penman M, Krieger M, Raetz CR: Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors ; *Nature.* 1991, *352* (6333), S.342-344
  88. Harlan JM: Leukocyte-endothelial interactions ; *Blood.* 1985, *65* (3), S.513-525
  89. Harris NR, Russell JM, Granger DN: Mediators of endotoxin-induced leukocyte adhesion in mesenteric postcapillary venules; *Circ Shock.* 1994, *43* (4), S.155-160
  90. Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R, Goyert SM : The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. ; *J Immunol.* 1988, *141* (2), S.547-552

91. Haziot A, Katz I, Rong GW, Lin XY, Silver J, Goyert SM: Evidence that the receptor for soluble CD14:LPS complexes may not be the putative signal-transducing molecule associated with membrane-bound CD14; *Scand J Immunol* . 1997, *46* (3), S.242-245
92. Haziot A, Tsuberi BZ, Goyert SM: Neutrophil CD14: Biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor-alpha in response to lipopolysaccharide ; *J Immunol* . 1993, *150* (12), S.5556-5565
93. Hein OV, Ohring R, Schilling A, Oellerich M, Armstrong VW, Kox WJ, Spies C : N-acetylcysteine decreases lactate signal intensities in liver tissue and improves liver function in septic shock patients, as shown by magnetic resonance spectroscopy: extended case report; *Crit Care* . 2004, *8* (2), S.R66-R71
94. Hickey MJ, Issekutz AC, Reinhardt PH, Fedorak RN, Kubes P: Endogenous interleukin-10 regulates hemodynamic parameters, leukocyte- endothelial cell interactions, and microvascular permeability during endotoxemia; *Circ Res* . 1998, *83* (11), S.1124-1131
95. Hinshaw LB, Emerson TE, Iampietro PF, Brake CM: A comparative study of the hemodynamic actions of histamine and endotoxin; *Am J Physiol* . 1962, *203* (4), S.600-606
96. Horton JW, Walker PB: Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion ; *J Appl Physiol* . 1993, *74* (4), S.1515-1520
97. Hoyert DL, Anderson RN: Age-adjusted death rates: Trend data based on the year 2000 standard population ; Hrsg.: National Vital Statistics Reports: Band 49. 2001 S.1-6
98. Hynes RO: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion; *Cell* . 1992, *69* (1), S.11-25
99. Janeway CA, Travers, P: Immunologie. Heidelberg, Berlin, Oxford , Spektrum, 1997
100. Janssen GH, Tangelder, Reneman RS: Different effects of anesthetics on spontaneous leukocyte rolling in rat skin; *Int J Microcirc Clin Exp* . 1997, *17* (6), S.305-313
101. Janssen GH, Tangelder GJ, Reneman RS: Spontaneous leukocyte rolling in venules in untraumatized skin of conscious and anesthetized animals; *Am J Physiol* . 1994, *267* (3 Pt 2), S. H1199-H1204
102. Bunting SA, Wurm FM, Chamow SM, Ashkenazi A: Jin H, Yang R, Marsters SA, Protection against rat endotoxic shock by p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor immunoadhesin: comparison with anti-TNF monoclonal antibody ; *J Infect Dis* . 1994, *170* (5), S.1323-1326
103. Johnston TD, Hampton WW, Fry DE: Septic hemodynamics produced by infusion of endotoxin; *Curr Surg* . 1989, *46* (2), S.101-103
104. Jungi TW, Sager H, Adler H, Brcic M, Pfister H: Serum factors, cell membrane CD14, and beta2 integrins are not required for activation of bovine macrophages by lipopolysaccharide; *Infect Immun* . 1997, *65* (9), S.3577-3584
105. Kastner U, Glasl S, Lugauer S, Guggenbichler JP: Sepsis- Neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie, Therapie und Prävention; Hrsg.: Antibiotika Monitor: S.1-20

106. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Lindenmann J: Allgemeine Bakteriologie, Morphologie und Feinstruktur der Bakterien. In: Wiesmann E, ed. Medizinische Mikrobiologie (Immunologie, Bakteriologie, Mykologie, Virologie, Parasitologie). 7 Stuttgart - New York, Georg Thieme Verlag, 1989 S.73-81
107. Kimura S, Yoshioka T, Shibuya M, Sakano T, Tanaka R, Matsuyama S: Indocyanine green elimination rate detects hepatocellular dysfunction early in septic shock and correlates with survival; Crit Care Med. 2001, 29 (6), S.1159-1163
108. Kirschning CJ, Wesche H, Merrill Ayres T, Rothe M : Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide; J Exp Med . 1998, 188 (11), S.2091-2097
109. Kox W, Spies C: Check-up Anästhesiologie. Heidelberg, Springer Medizin Verlag, 2003
110. Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD: Immunomodulatory therapies in sepsis; Intensive Care Med . 2000, 26 (Suppl 1), S.S124-S128
111. Kretzschmar M: ole oxygen free radicals in the pathophysiology of sepsis; Sepsis - current perspectives in pathophysiology and therapy. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag, 1994 S.122-135
112. Kreymann G. WM: Geschichte und Definition der Sepsis - Brauchen wir eine neue Terminologie? Anasthesiol ; Intensivmed Notfallmed Schmerzther . 1996, 31 (1), S.9-14
113. Kubes P, Grisham MB, Barrowman JA, Gaginella T, Granger DN: Leukocyte-induced vascular protein leakage in cat mesentery. ; Am J Physiol . 1991, 261 (6 Pt 2), S.H1872-H1879
114. Kuebler WM, Borges J, Sckell A, Kuhnle GE, Bergh K, Messmer K, Goetz AE: Role of L-selectin in leukocyte sequestration in lung capillaries in a rabbit model of endotoxemia ; Am J Respir Crit Care Med . 2000, 161 (1), S.36-43
115. Kuhns DB, Alvord WG, Gallin JI : Increased circulating cytokines, cytokine antagonists, and E-selectin after intravenous administration of endotoxin in humans; J Infect Dis . 1995, 171 (1), S.145-152
116. Kurose I, Suematsu M, Miura S, Fukumura D, Sekizuka E, Nagata H, Oshio C, Tsuchiya M : Oxyradical generation from leukocytes during endotoxin-induced microcirculatory disturbance in rat mesentery-attenuating effect of cetraxate; Toxicol Appl Pharmacol . 1993, 120 (1) , S.37-44
117. Küttler T: Pharmakologie und Toxikologie. 16 Neckarsulm Stuttgart, Jungjohann Verlagsgesellschaft, 1994 S.113,254
118. Lehmann C, Georgiew A, Weber M, Birnbaum J, Kox WJ: Reduction in intestinal leukocyte adherence in rat experimental endotoxemia by treatment with the 21-aminosteroid U-74389G; Intensive Care Med . 2001, 27 (1), S.258-63
119. Lenhartz H: Die septischen Erkrankungen . Wien, Hölder, 1903
120. Lentsch AB, Ward PA: Activation and regulation of NFkappaB during acute inflammation; Clin Chem Lab Med . 1999, 37 (3), S.205-208

121. Ley K: Histamine can induce leukocyte rolling in rat mesenteric venules; *Am J Physiol* . 1994, *267 (3 Pt 2)*, S.H1017-H1023
122. Ley K: Leukocyte adhesion to vascular endothelium; *J Reconstr Microsurg* . 1992, *8 (6)*, S.495-503
123. Ley K, Tedder TF: Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling; *J Immunol* . 1995, *155 (2)*, S.525-528
124. Linde-Zwirble WT, Angus DC: Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society; *Crit Care*. 2004, *8 (4)*, S.222-226
125. Loppnow H: Cytokines: Classification, receptors, mechanisms of action; *Internist* . 2001, *42 (1)* , S.13-4, 17-27
126. Luther B, Burger K, Paul D, Lehmann C, Buchali K: Zur Pathophysiologie der intestinalen Blutzirkulation. Tierexperimentelle Ergebnisse; *Angio* . 1990, *12 (5)*, S.173-184
127. Maejima K, Deitch E, Berg R. : Promotion by burn stress of the translocation of bacteria from the gastrointestinal tracts of mice; *Arch Surg* . 1984, *119 (2)*, S.166-172
128. Maejima K, Deitch EA, Berg RD: Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of rats receiving thermal injury; *Infect Immun* . 1984, *43 (1)*, S.6-10
129. Marshall JC, Christou NV, Meakins JL: The gastrointestinal tract. The "undrained abscess" of multiple organ failure; *Ann Surg* . 1993, *218 (2)*, S.111-119
130. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000; *N Engl J Med* . 2003, *348 (16)*, S.1546-1554
131. Martin TR, Mathison JC, Tobias PS, Leturcq DJ, Moriarty AM, Maunder RJ, Ulevitch RJ: Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide. Implications for cytokine production in normal and injured lungs ; *J Clin Invest* . 1992, *90 (6)*, S.2209-2219
132. Massignon D, Lepape A, Bienvenu J, Barbier Y, Boileau C, Coeur P: Coagulation/fibrinolysis balance in septic shock related to cytokines and clinical state; *Haemostasis* . 1994, *24 (1)*, S.36-48
133. Mayrovitz HN: Leukocyte rolling: A prominent feature of venules in intact skin of anesthetized hairless mice; *Am J Physiol* . 1992, *262 (1 Pt 2)*, S.H157-H161
134. McKechnie K, Furman BL, Parratt JR: Modification by oxygen free radical scavengers of the metabolic and cardiovascular effects of endotoxin infusion in conscious rats; *Circ Shock* . 1986, *19 (4)*, S.429-439
135. Minamiya Y, Abo S, Kitamura M, Izumi K, Kimura Y, Tozawa K, Saito S: Endotoxin-induced hydrogen peroxide production in intact pulmonary circulation of rat; *Am J Respir Crit Care Med*. 1995, *152 (1)*, S.348-354
136. Miura S, Tsuzuki Y, Kurose I, Suematsu M, Shigematsu T, Kimura H, Higuchi H, Serizawa H, Yagita H, Okumura K, Granger DN, Ishii H: Endotoxin stimulates lymphocyte-endothelial interactions in rat intestinal Peyer's patches and villus mucosa; *Am J Physiol* . 1996, *271 (2 Pt 1)*, S.G282-G292

- 
137. Moazzam F, Delano FA, Zweifach BW, Schmid-Schoenbein GW: The leukocyte response to fluid stress; *Proc Natl Acad Sci USA* . 1997, *94 (10)*, S.5338-5343
138. Moerer O, Schmid A, Hofmann M, Herklotz A, Reinhart K, Werdan K, Schneider H, Burchardi H: Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use; *Intensive Care Med* . 2002, *28 (10)*, S.1440-1446
139. Morgan RA, Manning PB, Coran AG, Drongowski RA, Till GO, Ward PD, Oldham KT: Oxygen free radical activity during live *E. coli* septic shock in the dog ; *Circ Shock* . 1988, *25 (4)*, S.319-323
140. Moskopp DWH: Zerebroprotektive Maßnahmen bei Energiekrisen des Gehirns. Zülrich, Biermann Verlag, 1994 S.142-148
141. Mullen PG, Fisher BJ, Walsh CJ, Susskind BM, Leeper-Woodford SK, Jesmok GJ, Fowler AA, Sugerman HJ: Monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha attenuates plasma interleukin-6 levels in porcine gram-negative sepsis; *J Surg Res*. 1994, *57 (5)*, S.625-31
142. Nakayama M, Hasegawa N, Oka Y, Lutzke B, McCall JM, Raffin TA: Effects of the lazareid, tirilazad mesylate, on sepsis-induced acute lung injury in minipigs; *Crit Care Med* . 1998, *26 (3)*, S.538-547
143. Navaratnam RL, Morris SE, Traber DL, Flynn J, Woodson L, Linares H, Herndon DN: Endotoxin (LPS) increases mesenteric vascular resistance (MVR) and bacterial translocation (BT); *J Trauma* . 1990, *30 (9)*, S.1104-1113
144. Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschuuren I, Van Der Meer JW, Kullberg BJ: The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis; *J Infect Dis* . 2002, *185 (10)*, S.1483-1489
145. Neugebauer E, Rixen D, Raum M, Schafer U: Thirty years of anti-mediator treatment in sepsis and septic shock- what have we learned? ; *Langenbecks Arch Surg*. 1998, *383 (1)*, S.26-34
146. Neugebauer EAH: Handbook of Mediators in Septic Shock. Florida, USA, CRC Press, Inc., 1993 S.565
147. Nevriere RR, Pitt HM, Piper RD, Sibbald WJ, Potter RF: Microvascular perfusion deficits are not a prerequisite for mucosal injury in septic rats; *Am J Physiol*. 1999, *276 (4 Pt 1)*, S.G933-G940
148. Nolte D, Hecht R, Schmid P, Botzlar A, Menger MD, Neumueller C, Sinowatz F, Vestweber D, Messmer K: Role of Mac-1 and ICAM-1 in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model of BALB/C mice; *Am J Physiol* . 1994, *267 (4 Pt 2)*, S.H1320-H1328
149. Oka Y, Murata A, Nishijima J, Yasuda T, Hiraoka N, Ohmachi Y, Kitagawa K, Toda H, Tanaka N, et al. : Circulating interleukin 6 as a useful marker for predicting postoperative complications; *Cytokine* . 1992, *4 (4)*, S.298-304

150. Opal SM, Cohen J: Clinical gram-positive sepsis: Does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? ; *Crit Care Med.* 1999, 27 (8), S.1608-1616
151. Ortolani O, Conti A, De-Gaudio AR, Moraldi E, Cantini Q, Novelli G : The effect of glutathione and N-acetylcysteine on lipoperoxidative damage in patients with early septic shock; *Am J Respir Crit Care Med* . 2000, 161 (6), S.1907-1911
152. Pena LA, Fuks Z, Kolesnick R : Stress-induced apoptosis and the sphingomyelin pathway; *Biochem Pharmacol* . 1997, 53 (5), S.615-621
153. Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E: Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality; *Chest* . 1993, 103 (2), S.565-575
154. Powell RJ, Machiedo GW, Rush-BF J, Dikdan GS: Effect of oxygen-free radical scavengers on survival in sepsis; *Am Surg* . 1991, 57 (2), S.86-88
155. Quezado ZMN, Natanson C, Hoffmann WD: Endotoxin in Septic Shock. In: Reinhart K, Eyrich K, eds. *Sepsis - current perspectives in pathophysiology and therapy*. Berlin Heidelberg New York , Springer Verlag, 1994 S.314-336
156. Radetsky M: The discovery of penicillin; *Pediatr Infect Dis J* . 1996, 15 (9), S.811-818
157. Rank N, Michel C, Haertel C, Lenhart A, Welte M, Meier-Hellmann A, Spies C: N-acetylcysteine increases liver blood flow and improves liver function in septic shock patients: results of a prospective, randomized, double-blind study; *Crit Care Med* . 2000, 28 (12), S.3799-3807
158. Redondo P, Subira ML: N-acetylcysteine inhibits production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta; *Arch Intern Med* . 1996, 156 (11) , S.1238, 1241
159. Reinhart K : Leitlinie Diagnose und Therapie der Sepsis- Methodenreport; Hrsg.: Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V.: 2005
160. Reinhart KB, Bloos F : Fortschritte in der Therapie der Sepsis; *Deutsches Ärzteblatt*. 2003, 100 (31-32), S.2080-2086
161. Revhaug A, Michie HR, Manson JM, Watters JM, Dinarello CA, Wolff SM, Wilmore DW: Inhibition of cyclo-oxygenase attenuates the metabolic response to endotoxin in humans ; *Arch Surg* . 1988, 123 (2), S.162-170
162. Riede U-N, Schaefer H-E: *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 3 Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag, 1993
163. Rohr U: Hrsg.: Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin: sCD14, TNF, Interleukin-6, sICAM-1 und sE-Selektin im septischen Geschehen. Dissertation . 1998
164. Roth E, Manhart N, Punz A: Role of antioxidants in Sepsis; *Intensivmedizin* . 1998, 35 (2) , S.95-105
165. Rychlik R: Sozioökonomische Relevanz der Sepsis in Deutschland; *Gesundh Ökon Qual Manag.* 2001, 5, S.67-72

166. Salvemini D, Riley DP, Lennon PJ, Wang ZQ, Currie MG, Macarthur H, Misko TP: Protective effects of a superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite decomposition catalysts in endotoxin-induced intestinal damage; *Br J Pharmacol* . 1999, *127* (3), S.685-692
167. Scalia R, Armstead VE, Minchenko AG, Lefer AM: Essential role of P-selectin in the initiation of the inflammatory response induced by hemorrhage and reinfusion; *J Exp Med* . 1999, *189* (6), S.931-93
168. Schiller HJ, Reilly PM, Bulkley GB: Tissue perfusion in critical illnesses. Antioxidant therapy; *Crit Care Med* . 1993, *21*, S.92-102
169. Schmidt H: Hrsg.: Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg: Tierexperimentelle Untersuchungen zur intestinalen Mikrozirkulation und zum intestinalen Purinstoffwechsel bei Endotoxinämie. Habilitation . 1997
170. Schmidt H, Ebeling D, Bauer H, Bach A, Böhrer H, Gebhard MM, Martin E: Ketamine attenuates endotoxin-induced leukocyte adherence in rat mesenteric venules; *Crit Care Med* . 1995, *23* (12), S.2008-2014
171. Schmidt H, Schmidt W, Müller T, Böhrer H, Bach A, Gebhard MM, Martin E : Effect of the 21-aminosteroid tirilazad mesylate on leukocyte adhesion and macromolecular leakage during endotoxemia; *Surgery* . 1997, *121* (3), S.328-334
172. Schmidt H, Schmidt W, Müller T, Böhrer H, Gebhard MM, Martin E : N-acetylcysteine attenuates endotoxin-induced leukocyte-endothelial cell adhesion and macromolecular leakage in vivo; *Crit Care Med*. 1997, *25* (5), S.858-863
173. Schmidt H, Secchi A, Wellmann R, Bach A, Böhrer H, Gebhard MM, Martin E: Effect of endotoxemia on intestinal villus microcirculation in rats; *J Surg Res* . 1996, *61* (2), S.521-526
174. Schmidt W, Schmidt H, Bauer H, Gebhard MM, Martin E: Influence of lidocaine on endotoxin-induced leukocyte-endothelial cell adhesion and macromolecular leakage in vivo; *Anesthesiology* . 1997, *87* (3) , S.617-624
175. Schmidt W, Walther A, Gebhard MM, Martin E, Schmidt H: Influence of N-acetylcysteine treatment on endotoxin-induced microcirculatory disturbances; *Intensive Care Med* . 1998, *24* (9), S.967-972
176. Schmidt W, Walther A, Gebhard MM, Martin E, Schmidt H: Influence of N-acetylcysteine treatment on endotoxin-induced microcirculatory disturbances; *Intensive Care Med*. 1998, *24* (9): , S.967-972,
177. Schneider J, Friderichs E, Heintze K, Flohe L: Effects of recombinant human superoxide dismutase on increased lung vascular permeability and respiratory disorder in endotoxemic rats; *Circ Shock*. 1990, *30*, S.97-106
178. Schottmüller H: Wesen und Behandlung der Sepsis; *Verhandl dt Kongress Inn Med* . 1914, *31*, S.257-280



179. Schumann RR, Leong SR, Flagg GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ: Structure and function of lipopolysaccharide binding protein ; *Science* . 1990, *249* (4975), S.1429-1431
180. Schuster HP, Werdan K: Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen . 3 Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio, Springer Verlag, 2000
181. Seiffge D, Bissinger T, Kremer E, Laux V, Schleyerbach R: Inhibitory effects of pentoxifylline on LPS-induced leukocyte adhesion and macromolecular extravasation in the microcirculation; *Inflamm Res* . 1995, *44* (7), S.281-286
182. Semrad SD, Rose ML, Adams JL: Effect of tirilazad mesylate (U74006F) on eicosanoid and tumor necrosis factor generation in healthy and endotoxemic neonatal calves ; *Circ Shock* . 1993, *40* (4),
183. Shong M, Ro HK, Kim YK, Yoo CJ, Lee JH, Song CU, Cho BY: The cytokines , interleukin-1 beta, interleukin-6, and interferon-gamma upregulate the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in rat thyroid cell line, FRTL-5; *Korean J Intern Med* . 1994, *9* (2), S.88-92
184. Slade E, Tamber PS, Vincent JL : The Surviving Sepsis Campaign: Raising awareness to reduce mortality; *Crit Care* . 2003, *7* (1), S.1-2
185. Spapen H, Zhang H, Demanet C, Vleminckx W, Vincent JL, Huyghens L: Does N-acetyl-L-cysteine influence cytokine response during early human septic shock?; *Chest* . 1998, *113* (6), S.1616-24
186. Spies CD, Reinhart K, Witt I, Meier HA, Hannemann L, Bredle DL, Schaffartzik W: Influence of N-acetylcysteine on indirect indicators of tissue oxygenation in septic shock patients: results from a prospective, randomized, double-blind study; *Crit Care Med* . 1994, *22* (11), S.1738-1746
187. Springer TA: Adhesion receptors of the immune system; *Nature* . 1990, *346* (6283), S.425-434
188. Springer TA: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm ; *Cell* . 1994, *76* (2), S.301-314
189. Steinmetz HT, Herbertz A, Bertram M, Diehl V : Increase in interleukin-6 serum level preceding fever in granulocytopenia and correlation with death from sepsis; *J Infect Dis* . 1995, *171* (1), S.225-228
190. Thiel M, Zourelidis C, Peter K: The role of polymorphonuclear neutrophilic leukocytes in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome (ARDS); *Anaesthesist* . 1996, *45* (2), S.113-130
191. Tonnesen MG: Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium; *J Invest Dermatol* . 1989, *93* (2 Suppl), S.S53-S58
192. Van Lambalgen AA, Rasker MT, van den Bos GC, Thijs LG: Effects of endotoxemia on systemic plasma loss and hematocrit in rats; *Microvasc Res* . 1988, *36*, S.291-304

193. van Lambalgen AA, van den Bos GC, Thijs LG: Changes in regional plasma extravasation in rats following endotoxin infusion; *Microvasc Res* . 1987, *34 (1)*, S.116-132
194. Volk T, Hensel M, Schuster H, Kox WJ : Secretion of MCP-1 and IL-6 by cytokine stimulated production of reactive oxygen species in endothelial cells ; *Mol Cell Biochem* . 2000, *206 (1-2)*, S.105-112
195. von-Andrian UH, Berger EM, Ramezani L, Chambers JD, Ochs HD, Harlan JM, Paulson JC, Etzioni A, Arfors KE: In vivo behavior of neutrophils from two patients with distinct inherited leukocyte adhesion deficiency syndromes; *J Clin Invest* . 1993, *91 (6)*, S.2893-2897
196. Warner A, Bencosme A, Healy D, Verme C : Prognostic role of antioxidant enzymes in sepsis: preliminary assessment; *Clin Chem* . 1995, *41 (6 Pt 1)*, S.867-871
197. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH: Sepsis and septic shock - A review of laboratory models and a proposal; *J Surg Res* . 1980, *29*, S.189-200
198. Xu D, Qi L, Guillory D, Cruz N, Berg R, Deitch EA : Mechanisms of endotoxin-induced intestinal injury in a hyperdynamic model of sepsis; *J Trauma* . 1993, *34 (5)*, S.676-682
199. Yi ES, Ulich TR: Endotoxin, interleukin-1, and tumor necrosis factor cause neutrophil-dependent microvascular leakage in postcapillary venules; *Am J Pathol* . 1992, *140 (3)*, S.659-663
200. Yuan Y, Fleming BP: A method for isolation and fluorescent labeling of rat neutrophils for intravital microvascular studies; *Microvasc Res*. 1990, *40*, S.218-229
201. Zander R: Arterial-intramuscular CO<sub>2</sub>-partial pressure difference (aiDCO<sub>2</sub>); *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* . 1998, *33 Suppl 2*, S.S52-S53
202. Zhang H, Spapen H, Manikis P, Rogiers P, Metz G, Buurman WA, Vincent JL: Tirilazad mesylate (U-74006F) inhibits effects of endotoxin in dogs; *Am J Physiol* . 1995, *268 (5 Pt 2)*, S.H1847-H1855
203. Zhang H, Spapen H, Nguyen DN, Benlabed M, Buurman WA, Vincent JL: Protective effects of N-acetyl-L-cysteine in endotoxemia; *Am J Physiol* . 1994, *266 (5 Pt 2)*, S.H1746-H1754
204. Zhang H, Spapen H, Nguyen DN, Rogiers P, Bakker J, Vincent JL: Effects of N-acetyl-L-cysteine on regional blood flow during endotoxic shock; *Eur Surg Res* . 1995, *27 (5)*, S.292-300
205. Ziegler E: *Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie*. Jena, Fischer Verlag, 1905
206. Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ : CD14: cell surface receptor and differentiation marker; *Immunol Today* . 1993, *14 (3)*, S.121-125

## **Danksagung**

Ich bedanke mich sehr bei Frau Professor Dr. Claudia Spies für die Überlassung des Themas und die Förderung der wissenschaftlichen Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank geht an Oberarzt Dr. Jürgen Birnbaum und Professor Dr. Christian Lehmann, die konstruktive Kritik und Hilfestellung bei der Abfassung dieser Arbeit leisteten.

Des Weiteren geht ein großer Dank an Tania Schink, die mir mit sehr viel Geduld bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse beiseite stand und Frau Barbara Egerer für ihre Hilfe bei der biochemischen Bestimmung der Laborparameter.

Ebenso danke ich recht herzlich meinem Kollegen Jewgenij Feller, ohne den die Durchführung des tierexperimentellen Teiles nicht in dieser Qualität und Kürze möglich gewesen wäre. Im Weiteren gilt mein Dank Nina Polze und Daniel Luther für die ausgezeichnete Einarbeitung in die Methodik und in die operativen Techniken. Darüber hinaus danke ich dem Team der Tierpfleger für die sorgsame Betreuung der Versuchstiere.

Außerdem danke ich meiner lieben Familie und meinen lieben Freunden, die mir hilfreich zur Seite standen und mich stets motivierten.

Mein unermesslicher Dank gilt meinen Eltern, die mir das Medizinstudium mit allen nötigen Vorausbildungen ermöglichten und mir durch ihre liebevolle Erziehung viel Kraft gegeben haben.

## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name:	Julia Müller
Geburtstag:	18.08.1976
Geburtsort:	Darmstadt
Familienstand:	ledig
Eltern:	Helga Schlote, geb. Hübsch und Dr. Ing. Falko Müller
Geschwister:	Anja Röglin, geb. Müller

### Schulbildung

1983-1987	Rehberggrundschule, Roßdorf/Hessen
1987-1989	Franz-Marc-Grundschule, Berlin
1989-1996	Gabriele-von-Bülow Oberschule, Berlin

### Berufsausbildung

1996-1999	Ausbildung zur Biologielaborantin Schering AG Berlin
Juni 1999-Okt. 1999	Biologielaborantin in der experimentellen Toxikologie, Schering AG Berlin
Okt. 1999	Beginn des Studiums der Humanmedizin, Medizinische Fakultät der Charité- Universitätsmedizin Berlin
Okt. 2001	Ärztliche Vorprüfung
Sept. 2002	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Sept. 2004	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Okt. 2004-Okt. 2005	Praktisches Jahr
Dez. 2005	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Feb. 2006	Assistenzärztin Klinik Sanssouci, Potsdam

## **Erklärung an Eides Statt**

„Ich, Julia Müller, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Tierexperimentelle Untersuchung des Einflusses von N-Acetylcystein in Kombination mit Tirilazad Mesylat auf die mesenteriale Plasmaextravasation und Leukozytenadhärenz bei Endotoxinämie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 18.08.2006

Julia Müller